

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Kommissarischer Direktor: Professor Dr. Dr. Dieter Bröring
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DER MUC-1-SPEZIFISCHEN ZELLULÄREN ANTWORT
BEI PANKREASKARZINOMEN IM RAHMEN EINER MUC-1
PEPTIDVAKZINESTUDIE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SEYED KIARASCH MORTAZAWI

aus **Teheran**

Kiel **2009**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. von Bernstorff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kabelitz
Tag der mündlich Prüfung: 07.10.2009
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.10.2009

gez.: Prof. Dr. Dr. Schünke
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Gewidmet meinen Eltern

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

Thorstein Bunde Veblen

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cpm	counts per minutes
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom, Lynch-Syndrom
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LDA	Limiting-Dilution Assay
MHC	Major histokompatibility complex
NKZ	Natürliche Killerzellen
PBC	Polychlorierte Biphenyle
PHA	Phytohaemagglutinin
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
R0	Tumorresektion ohne Nachweis von mikroskopischen und makroskopischen Tumorresten
RLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
5JÜR	Fünfjahres Überlebensrate

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Das Pankreaskarzinom	8
1.1.1	<i>Epidemiologie.....</i>	9
1.1.2	<i>Ätiologie</i>	9
1.1.3	<i>Prognose.....</i>	10
1.1.4	<i>Therapie</i>	10
1.2	Das Tumorantigen MUC-1 und die Bedeutung für die Immuntherapie	12
1.3	IFN-γ ELISPOT-Assay und die Bedeutung von IFN-γ.....	13
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material.....	15
2.1	Patienten und Patientenproben.....	15
2.2	Kontrollproben	15
2.3	Reagenzien	16
2.4	Zellkulturmedien	16
2.5	Kits.....	17
2.6	Antikörper.....	17
2.7	Tumorspezifisches MUC-1 Polypeptid.....	17
2.8	Stimulanzen	17
2.9	Verbrauchsmaterialien	18
2.10	Geräte	18
3	Methoden	19
3.1	Zellkultur	19
3.2	Ficoll-Präparation der peripheren Blut-Lymphozyten (PBL).....	19
3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	19
3.4	Zellzahlbestimmung	20
3.5	³H-Thymidin-Proliferationsassay.....	20
3.6	IFNγ-ELISPOT-Assay	21
3.6.1	<i>Etablierung des Versuchsystems mit gesunden Spender-PBL</i>	21
3.6.2	<i>Etablierung des Versuchsystems mit Patientenproben</i>	21
3.6.3	<i>Analyse der Patientenproben</i>	22
3.7	Statistische Methoden	24
4	Ergebnisse	25

4.1	Ergebnisse des 3H-Thymidin-Proliferationsassays.....	25
4.2	Ergebnisse der Etablierung des Versuchsystems mit gesunden Spender-PBL	26
4.2.1	<i>Testreihe I: Ermittlung der Stimulationsdauer</i>	<i>26</i>
4.2.2	<i>Testreihe II: Ermittlung der Unterschiede zwischen PHA und PMA/Ionomycin.....</i>	<i>27</i>
4.3	Ergebnisse der Etablierung des Versuchsystems mit Patienten-PBL	28
4.3.1	<i>Testreihe III: Ermittlung der Stimulationsdauer.....</i>	<i>28</i>
4.3.2	<i>Testreihe IV: Ermittlung der Unterschiede zwischen PHA und PMA/Ionomycin</i>	<i>30</i>
4.3.3	<i>Testreihe V.....</i>	<i>30</i>
4.4	Ergebnisse der Analyse der Patientenproben.....	31
4.5	Ergebnisse der statistischen Methoden	39
4.5.1	<i>Zellwachstum.....</i>	<i>39</i>
4.5.2	<i>IFNγ-Produktion.....</i>	<i>39</i>
5	Diskussion	40
5.1	Etablierung des Versuchsystems.....	42
5.2	Analyse der Patientenproben	44
6	Zusammenfassung.....	51
7	Literaturverzeichnis	53
8	Anhang	65
	Danksagung.....	69
	Lebenslauf	70

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein vom Gangepithel oder den Azinuszellen ausgehender Tumor, welcher fast ausschließlich bei Erwachsenen vorkommt. Nach der WHO-Klassifikation, beschrieben von Klöppel et al. und Solcia et al. [1,2,3], unterscheidet man bei den Tumoren des exokrinen Pankreas benigne und maligne Formen. Eine Besonderheit stellen sogenannte Borderline-Tumoren mit einer unsicheren malignen Potenz dar, auf die aber nicht näher eingegangen werden soll. Zu den Gutartigen zählt man die muzinösen und die etwas selteneren serösen Zystadenome. Die malignen Neoplasien teilen sich auf in seröse und muzinöse Zystadenokarzinome, das intraduktale-papillär-muzinöse Karzinom, das Azinuszellkarzinom und das duktales Karzinom. Letzteres macht mit über 80% den größten Anteil aus, die Azinuszellkarzinome sind mit einer Häufigkeit von ca. 13% die zweithäufigsten Tumoren des Pankreas [4].

Etwa 95% der Pankreastumoren haben ihren Ursprung im exokrinen Pankreas und sind zu 98% maligne. In ca. 2/3 der Fälle handelt es sich um Pankreaskopfkarzinome oder um Papillenkarzinome, lokalisiert im Bereich der Papilla duodeni major. In 1/3 der Fälle befinden sie sich im Korpus- oder Schwanzbereich. Ungefähr 10% der Tumoren betreffen das gesamte Pankreas [5].

Eine weitere Einteilung ist in Anlehnung an die geltende Version der TNM-Klassifikation möglich [6]. Unterteilt wird hierbei in sechs Stadien (0, I, II, III, IVA und IVB) unter Berücksichtigung der Tumorausbreitung (T), des regionalen Lymphknotenbefalls (N) und der Fernmetastasierung (M).

1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei ~10/100000 Einwohnern, für die USA bei ~14/100000 Einwohnern, hingegen in Südostasien bei ~2,2/100000. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 67 Jahren, für Frauen bei 75 Jahren, wobei außerhalb Deutschlands insgesamt Männer häufiger erkranken als Frauen [5,7]. Hinsichtlich der tumorbedingten Todesursache steht das Pankreaskarzinom in Europa an fünfter bis sechster Stelle, in den USA liegt es bereits an vierter Stelle [8]. Nach den aktuellen Daten der Deutschen Krebsgesellschaft ist es die vierthäufigste Todesursache für Frauen und die fünfhäufigste Todesursache für Männer in Deutschland. Jährlich versterben etwa 12000 Patienten an einem Pankreaskarzinom deutschlandweit [9].

1.1.2 Ätiologie

Das Rauchen von Zigaretten konnte bisher als wichtigster Risikofaktor sowohl in präklinischen als auch in epidemiologischen Studien bestätigt werden [10,11]. Zusätzlich zum Zigarettenkonsum scheinen auch diätetische Faktoren, wie hoher Fleisch- und Fett- sowie niedriger Obst- und Gemüsekonsum und zusätzlich ein erhöhter Alkoholgenuss entscheidende Risikofaktoren zu sein [11]. Auch beruflichen Noxen wie 2-Naphtylamin, PCB, Benzidin und Benzolderivaten wird eine Bedeutung zugeschrieben [5].

Weitere bedeutende ätiologische Faktoren sind Zustand nach Magenresektion und Begleit- und Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, chronische oder hereditäre Pankreatitiden [12, 13, 14].

Hinweise auf familiäre und ethnische Häufungen sowie vermehrtes Auftreten bei hereditären Erkrankungen wie dem Lynch-Syndrom (HNPCC), der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP), dem familiären atypischen multiplen Melanom und der hereditären Pankreatitis stammen aus epidemiologischen Studien, die eine Risikoerhöhung für Patienten und Angehörige für die Entwicklung von Pankreastumoren angeben [15,16,17]. Die Prävalenz der familiären Pankreaskarzinome beträgt in Deutschland 2-3% [18].

Auch genetische Veränderungen sind nachgewiesen worden. Untersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb der gastrointestinalen Tumoren bei Pankreaskarzinomen die höchste Inzidenz von Punktmutationen im Bereich des Ki-ras Onkogens, assoziiert mit einer ebenfalls hohen Mutationsrate von Tumorsuppressorgenen (p53, p16INK4A und SMAD4/DPC-4) zu finden ist [19, 20].

1.1.3 Prognose

Etwa 10-20% der Pankreaskarzinompatienten präsentieren sich bei der Primärdiagnose mit einem resektablen Karzinom, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate (5JÜR) bei weniger als zwei Prozent liegt. Bei einem resektablen Primärtumor beträgt die mediane Überlebenszeit 10-12 Monate [21]. Bei den meisten Patienten wird aber ein lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium diagnostiziert. Ohne eine adäquate Therapie liegt die Überlebenszeit im metastasierten Erkrankungsstadium bei etwa drei bis vier Monaten [22]. Damit hat das Pankreaskarzinom unter allen gastrointestinalen Karzinomen die schlechteste Prognose. Bei kurativer Resektion (R0) kann eine 5JÜR von 15-20% erreicht werden. Stadienabhängig ist von folgender Prognose auszugehen [5]:

Tabelle 1 Stadienabhängige Prognose des Pankreaskarzinoms

Stadium UICC		Mediane Überlebenszeit (Monate)	2-Jahresüberlebensrate (%)
I	(lokal begrenzt)	12-18	20-35
II/ III	(lokal fortgeschritten)	4-6	10
IV	(metastasiert)	3	0

1.1.4 Therapie

Zur Behandlung des Pankreaskarzinoms werden chirurgische Verfahren, Chemotherapie und Strahlentherapie sowie neuere Methoden, wie die Immuntherapie, eingesetzt. Nach wie vor stellt beim nichtmetastasierten Pankreaskarzinom die Operation die Therapie der Wahl dar, zugleich ist sie auch der einzige kurative Behandlungsansatz [23, 24]. Die operative Behandlung kann durch eine Radiochemotherapie ergänzt werden [25]. Die adjuvante Radiochemotherapie hat sich als günstig erwiesen [26] und wird im Anschluss an die Operation durchgeführt, um Tumorreste und Tochtergeschwülste, die unter Umständen noch nicht nachweisbar sind, zu zerstören. Eine andere Möglichkeit ist die neoadjuvante Radiochemotherapie, welche vor der Operation erfolgt, um die Tumormasse zu verkleinern und so eine bessere Ausgangsposition für die Operation zu erreichen. Ist jedoch die Krankheit so weit fortgeschritten, dass von einer vollständigen Heilung nicht mehr ausgegangen werden kann, erfolgt eine palliative Behandlung. Diese dient vornehmlich der Verbesserung der Lebensqualität sowie der Schmerzbehandlung. Auch hier kommen chirurgische Verfahren, wie beispielsweise Bypassoperationen und Stentimplantationen, sowie Chemo- bzw. Radiotherapie zum Einsatz [27]. Als derzeitiger empfohlener Behandlungsstandard hinsichtlich der Monochemotherapie gilt das Gemcitabin [28, 29]. In dem Versuch, die therapeutische Effektivität durch eine Kombinationstherapie zu steigern, wurden zahlreiche

Studien durchgeführt, die einen Vergleich mit der Monotherapie aufzustellen versuchten. Zwar konnten Ansprechraten und progressionsfreie Zeiten teils verbessert werden, ein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit konnte aber nicht in allen Studien nachgewiesen werden [21].

Die alleinige Strahlentherapie als palliatives Therapieverfahren dient hauptsächlich der Schmerzreduktion.

Trotz der oben genannten Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose immer noch ungünstig, so dass nach neuen Therapieansätzen gesucht werden muß. Eine dieser neuen Möglichkeiten für die Behandlung von Karzinompatienten ist die Immuntherapie [30, 31]. Ziel ist es, das Immunsystem so zu aktivieren, dass es den Tumor dort zerstören kann, wo chirurgische Verfahren und Radio-Chemotherapien nicht effizient genug eingreifen können. Staib et al. [32] fassten in ihrer Arbeit die unterschiedlichen Ansatzpunkte einer Immuntherapie bei Pankreaskarzinompatienten zusammen, welche in folgender Tabelle veranschaulicht sind:

Tabelle 2 Therapieansätze der Immuntherapie

Ansatzpunkte	Effekt	Beispiele
Spezifische Aktivierung	Aktivierung von spezifischen Effektorzellen (CTL, antikörpergebundene Makrophagen) durch Tumorantigene	Synthetische Tumorantigene
Nichtspezifische Aktivierung	Aktivierung von nichtspezifischen Effektorzellen (Makrophagen, NKZ) durch mikrobielle oder chemische Adjuvantien	Pertussis-Toxin, Interferon- α , - β
Passiv	Gabe von AK oder Vektoren	Monoklonale AK, Immunkonjugate
Adoptiv	Transfer von immunaktiven Zellen oder Molekülen	IL-2, GM-CSF, lymphokin aktivierte Killerzellen
Wiederherstellung	Wiederherstellung von defekten Immunfunktionen, Unterdrückung von Suppressorfaktoren	Levamisol, Cyclophosphamid, Prostaglandin-Synthetase-Inhibitor
Zell-Modulation	Hochregulation von tumorassoziierten Antigenen oder MHC-Antigenen auf Tumorzellen	IFN- γ , Levamisol (+5-FU)

Sie wiesen darauf hin, dass es für das Pankreaskarzinom einige Belege für eine spezifische Immunantwort gibt, die für einen immuntherapeutischen Ansatz genutzt werden können. Dies gilt unter anderem für die von Wahab et al. indentifizierten spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) [33], sowie für verschiedene tumorassoziierte Antigene, wie den Muzinen, dem Glykoprotein GA733 und p-21 ras. In der Studie wurde die Bedeutung und der Einfluss von spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Antikörpern (AK), die Kombination solcher AK mit Zytokinen und der Effekt einer Vakzinierung mittels oben genannter Tumorantigene untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass durchaus eine positive

Immunantwort und T-Zell-Aktivierung erreicht werden konnte. Zusätzlich konnte das Tumorstadium und die Tumorstadien positiv beeinflusst werden.

Allerdings war der Effekt recht gering ausgeprägt und die Ergebnisse konnten teilweise nur im Tiermodell nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie von Yamamoto et al. [34] konnte der positive Einfluss einer Peptidvaksinierung hinsichtlich der humoralen und zellulären Immunantwort sowie der Überlebenszeit bestätigt werden. Auch wenn die Immuntherapie einige Vorteile gegenüber den konventionellen Methoden, beispielsweise im geringeren Nebenwirkungspotenzial, zu haben scheint, so muss man bedenken, dass hinsichtlich des Pankreaskarzinoms dieses Therapieverfahren noch am Anfang steht und keinen Ersatz darstellt. Lygidakis et al. [35] führten eine Studie durch, in der Pankreaskarzinompatienten mit einer Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie behandelt wurden. Trotz der auf den ersten Blick gegensätzlich scheinenden Wirkungsweise (immunsuppressiv durch die Chemotherapie, immunstimulierend durch die Immuntherapie) verzeichneten sie unter anderem einen Anstieg der Überlebenszeit, erhöhte IL-2- und IFN γ -Spiegel, eine Zunahme der CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Zellrate und eine Tumorstadienregression.

All diese neuen Therapieansätze sollten als zusätzliche Bausteine für die Etablierung eines effektiven Behandlungsschemas aus modernen chirurgischen Methoden kombiniert mit chemo- und immuntherapeutischen Verfahren angesehen werden.

1.2 Das Tumorstadien MUC-1 und die Bedeutung für die Immuntherapie

Muzine (MUC) sind große Glykoproteine (> 200 kDa), welche sich bei gesunden meist epithelialen Zellen an der duktalen Zellmembran befinden. Durch luminalen Abschliffungen sind sie von Bedeutung für den Schutz der Mukosa. Zusätzlich sind sie an der Zell-Kommunikation beteiligt. Durch die apikal ausgerichtete Expression sind sie im peripheren Blut so gut wie nicht nachweisbar.

MUC-1 ist nur eines von mehr als zwölf untersuchten Muzinen, jedoch wurde es in der Vergangenheit intensiv erforscht und stellt ein ideales Antigen für die Tumorstadien-Immuntherapie dar [36, 37]. Es weist einige Unterschiede bei maligne entarteten Zellen auf: Es kann ungerichtet an jedem Ort der Zelle eingebaut sein und gelangt so in Kontakt zur Blutbahn und zu den Immunzellen, zusätzlich ist es bei den meisten Karzinomen, vor allem aber bei Pankreaskarzinomen, überexprimiert [38, 39]. Des Weiteren sind die Muzin-Moleküle unterglykosiliert, dadurch werden bestimmte Abschnitte freigelegt, die normalerweise maskiert sind. Diese demaskierten Abschnitte bestehen aus sich wiederholenden Polypeptidketten (sog. Tandem-repeats) und konnten als Tumorstadien-Epitop identifiziert werden.

Diese Besonderheit ermöglicht es dem Immunsystem, die Tumorzellen zu erkennen und eine humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren [40]. Diverse Vakzinierungsstudien mit synthetischen MUC-1 Polypeptiden konnten einen positiven Einfluss auf das Immunsystem durch gesteigerte AK-Bildung, einen Anstieg der T-Zell-Proliferation oder auch eine vermehrte Zytokinproduktion, insbesondere Interferon- γ (IFN γ), zeigen [41-45].

1.3 IFN- γ ELISPOT-Assay und die Bedeutung von IFN- γ

In dieser Arbeit wird die Etablierung eines modifizierten ELISPOT-Assays zur Bestimmung von CTL bzw. der IFN γ -Sekretion durch eine unspezifische Stimulation mit PHA und eine spezifische Stimulation durch das Tumorantigen MUC-1 beschrieben.

Während der letzten 20 Jahre gewann der ELISPOT immer mehr an Bedeutung und ist eine der wichtigsten und sehr häufig angewendeten Methoden hinsichtlich der Erforschung der Immunantwort [46]. Dieser ist geeignet für die Messung von Peptid-spezifischen T-Zellen und zugleich eine sensitive Methode für die Zytokinbestimmung auf Einzellzebene.

Das Prinzip basiert auf einer Antikörper vermittelten Visualisierung von Zytokinen. Die sezernierten Zytokine werden durch membranständige Antikörper auf einer Filtermembran gebunden und durch eine anschließende Interaktion mit einem weiteren Antikörper und eines Farbindikators sichtbar gemacht. Anschließend erfolgt die manuelle oder Computer-assistierte Auszählung. Während der ELISPOT häufig eingesetzt wurde, um antivirale T-Zell-Effekte zu studieren, gibt es weitaus weniger Studien, die sich mit einer T-Zell-Antwort nach Vakzinierung mit Tumorantigenen befassen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der ELISPOT immer mehr an Bedeutung für die Tumorforschung und vor allem für die Etablierungen von Vakzinierungstherapien gewonnen hat [47, 48, 3]. Es stellt eine sensitive, präzise und kosteneffektive Methode dar und eignet sich besonders für die Detektierung von tumorspezifischen CTL und zur Quantifizierung der antigeninduzierten Zytokinsekretion [49, 50]. Auch im Vergleich zu anderen Analysetechniken (ELISA, Flow Cytometrie und Real-time PCR) wird beim ELISPOT eine hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität erreicht, besonders bei geringen Zellpopulationen [51, 52].

Auf Grund der geringen Anzahl an Patientenproben bzw. der in den Proben geringen Anzahl an T-Zellen, wurde bewusst der ELISPOT für die Versuche ausgewählt. Prinzipiell wäre eine zusätzliche Bestimmung durch Flow Cytometrie denkbar gewesen, aber die Proben hätten hierfür nicht ausgereicht. Daher wurde auf weitere Bestimmungsmethoden verzichtet.

IFN- γ ist ein stimulierendes TH1-Zytokin (T-Helferzell-Zytokin), welches von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NKZ) synthetisiert wird. Es spielt eine wichtige

Rolle für die Immunregulation und inflammatorische Prozesse. Es erhöht beispielsweise die MHC-II gekoppelte Antigen-Expression, es aktiviert Monozyten sowie NKZ [53]. Zusätzlich korreliert es mit der spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Zytotoxizität und wirkt sich positiv auf das Überleben der Patienten bei verschiedenen Karzinomen aus [54-56, 45].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In Kooperation mit Frau Professor Olivera Finn, PhD, Pittsburgh Cancer Center, Pennsylvania, USA, wurde an der Universitätsklinik Kiel eine klinische Phase I/II Studie zur in vivo Immunisierung von Patienten mit einem periampullären oder duktalem Pankreasadenokarzinom mittels einer synthetischen Vakzine aus einem tumorspezifischen repetitiven MUC-1 Polypeptid und dem Adjuvans SB-AS-2 durchgeführt. Zur Überprüfung und zum Monitoring der unspezifischen sowie der spezifischen Immunität wurden von den Patienten periphere Blutzellen vor Beginn der Vakzinierungstherapie, zum Zeitpunkt der Operation, sowie in regelmäßigen Abständen postoperativ abgenommen und kryokonserviert. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte die spezifische zelluläre Antwort der Immunzellen auf das MUC-1 Polypeptid untersucht werden.

Zuerst mussten mittels eines ³H-Thymidin-Proliferationsassays die Vitalität und die Proliferationseigenschaften der Zellen in den Proben untersucht werden.

Anschließend erfolgte die Etablierung eines IFN γ -ELISPOT-Assays, mit dem die spezifische, gegen das Tumorantigen MUC-1 gerichtete T-Zellantwort analysiert werden sollte. In diesem Zusammenhang wurde die IFN γ -Sekretion nach unspezifischer bzw. spezifischer Stimulation gemessen und diese miteinander verglichen. Zusätzlich sollten eventuell im Zeitverlauf der Studie vorhandene quantitative Unterschiede in der Zytokinsekretion herausgefunden werden. Des Weiteren wurden die Proliferationseigenschaften der Zellen untersucht, auch hier sollten eventuell vorhandene quantitative Unterschiede aufgezeigt werden.

Zuletzt sollte der Einfluss der Lagerung, der Kryokonservierung und des Auftauens auf die Zytokinproduktion demonstriert werden.

2 Material

2.1 Patienten und Patientenproben

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenproben stammen aus einer klinischen Phase I/II Studie zur in vivo Immunisierung von Patienten mit histologisch gesichertem Pankreasadenokarzinom mittels einer Vakzine aus einem synthetischen, tumorspezifischen, repetitiven MUC-1 Polypeptid. Insgesamt konnten die Proben von 12 von ursprünglich 51 Patienten ausgewertet werden. Die Auswahlkriterien bestanden einerseits darin, dass mindestens fünf Proben pro Patient zur Verfügung standen und andererseits darin, dass Proben vom Beginn, der Mitte und vom Ende der Studie verfügbar und analysierbar waren. Das Patientenkollektiv teilte sich auf in sechs Männer (Alter: 51–69 Jahre, Durchschnittsalter: 61 Jahre) und sechs Frauen (Alter: 57–72 Jahre, Durchschnittsalter: 65 Jahre). Bei sieben Patienten bestand ein duktales Pankreaskopfkarzinom, bei Vieren ein Papillenkarzinom und bei Einem ein duktales Pankreaskorpuskarzinom.

Bei allen Patienten wurde ein operativer Eingriff vollzogen (zehn Whipple-Operationen, eine biliodigestive Anastomose mit Gastroenterostomie und eine erweiterte Linksresektion mit RLA). Zusätzlich wurden Blutproben vor Beginn der Vakzinierungstherapie, zum Zeitpunkt der Operation, sowie in regelmäßigen Abständen postoperativ entnommen. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficollgradienten wurden aus dem heparinisierten Vollblut PBL gewonnen und zur Langzeitlagerung bei -80°C kryokonserviert.

2.2 Kontrollproben

Es wurden in verschiedenen Abständen Blutproben von einem gesunden Spender entnommen und die PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierbei handelte es sich immer um dieselbe Person. Die so gewonnen Lymphozyten wurden für alle im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet, sowohl für die Etablierungsversuche als auch für den IFN γ -ELISPOT. Im letzteren Fall zunächst zur Etablierung des Versuchsystems und dann als Positivkontrolle zum Vergleich mit den Patientenproben.

2.3 Reagenzien

Produkt	Hersteller
AIM-V-Medium	Gibco, Karlsruhe
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC-Tabletten)	Sigma, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 0,2N	Merck, Darmstadt
Ficoll-Plaque Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Fötales Kälberserum (FCS) 10%	Hyclone, Logan, UT, USA
Human-Albumin	Octapharma, Langenfeld
Hydrogen-Peroxidase	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 2mM	Life Technologies, Eggenstein
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat 1mM	Life Technologies, Eggenstein
N,N-Dimethyl-formamide	Sigma, München
Penicillin (10000 Einheiten/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
Steriles Wasser	Braun
Streptomycin-Sulfat (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

2.4 Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der Patienten- und Probanden-Lymphozyten wurde RPMI 1640-Medium (Gibco, Karlsruhe) verwendet, welches mit steril filtriertem 2mM L-Glutamin, 1mM Natrium-Pyruvat und 10% FCS versetzt wurde. Im Folgenden wird dieses Medium als Kulturmedium bezeichnet.

Als Medium für den IFN γ -ELISPOT wurde AIM-V-Medium verwendet, nach Zugabe von hitzeinaktiviertem 10% Human-Albumin, 2mM L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin. Im Folgenden wird dieses Medium als Assay-Medium bezeichnet.

Als Einfriermedium für die isolierten Probanden-Lymphozyten diente FCS versetzt mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO).

2.5 Kits

Produkt	Hersteller
Avidin Peroxidase-Komplex, Vectastain Elite Kit PK-6100	Schultheiß, Kronshagen

2.6 Antikörper

Produkt	Host	Hersteller
mAB 1-D1K	Maus (monoklonal)	Mabtech, Nacka, Schweden
mAB 7-B6-1	Maus (monoklonal)	Mabtech, Nacka, Schweden

2.7 Tumorspezifisches MUC-1 Polypeptid

Das tumorspezifische MUC-1 Polypeptid wurde am Pittsburgh Cancer Center in Pennsylvania synthetisiert. Es enthielt eine fünffache Wiederholung (sog. tandem repeats) des tumorspezifischen, 20 Aminosäuren-langen Grundpeptids des Mucin-I-Glykoproteins. Das so synthetisierte Polypeptid wurde in einer Gesamtkonzentration von 100 µg/50µl zur Langzeitlagerung bei -80°C kryokonserviert.

2.8 Stimulanzen

Produkt	Hersteller
Ionomycin (5 mM)	Sigma, München
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), (5 ng/ml)	Sigma, München
Phytohemagglutinin (PHA), (5 µg/ml)	Braun, Melsungen

2.9 Verbrauchsmaterialien

Produkte	Hersteller
6, 12, 24 Well Multidish	Nunc, Wiesbaden
Cryo Tubes	Nunc, Wiesbaden
Multiply-Pro Gefäße 0,2ml	Sarstedt, Nümbrecht
MultiScreen-HA Sterile Cleare Plates 96 Well, Nitrocellulose	Millipore, Billerica, MA, USA
Reagenz- und Zentrifugenröhren 15ml und 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter Filtropur S 0,2, S 0,45	Sarstedt, Nümbrecht

2.10 Geräte

Produkt	Hersteller
BIOREADER®-3000 CL/PRO	Bio-Sys, Karben
Cell-Counter Modul TT CASY 1 Technology	Schärfe-System, Reutlingen
Nuaire US Autoflow CO ₂ Water-Jacketed Incubator	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Nuaire Biological Safety Cabinets Class II	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Rotina 48 R Zentrifuge Nr. 4370	Hettich, Tuttlingen

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Sämtliche für die Versuche verwendete Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, auf Platten der Firma Nunc (Wiesbaden) in Kulturmedium im Nuaire-Inkubator bei 37°C mit 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2 Ficoll-Präparation der peripheren Blut-Lymphozyten (PBL)

Die Gewinnung von PBL erfolgte über eine Dichtezentrifugation. Hierzu wurde das heparinisierte Vollblut des gesunden Spenders 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In 50ml Falcon Zentrifugationsröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 15ml Ficoll-Paque Plus vorgelegt und vorsichtig mit 25ml verdünntem Heparin-Vollblut überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400g, 20°C, ohne Bremse und mit minimaler Anlaufgeschwindigkeit für 40min. Entsprechend ihrer Dichte sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten auf den Boden des Röhrchens, während unterhalb der Plasma-PBS-Phase eine zarte weißmilchige Interphase aus Lymphozyten verblieb. Diese wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgenommen und in ein neues 50ml Röhrchen überführt. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 250g für drei Minuten bzw. für fünf Minuten. Danach wurden die Zellen in eine 250ml Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) in Kulturmedium aufgenommen und für eine Stunde im Nuaire-Inkubator inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der nicht adhärenen Zellen für fünf Minuten wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zur Langzeitlagerung in Einfriermedium überführt und in Cryo Tubes kryokonserviert.

3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die gewonnenen PBL des gesunden Spenders in FCS/10% DMSO aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Cryo Tubes gefüllt und in einen vorgekühlten Nalgene-Einfrierbehälter (Nalge, Neerijse, Belgium) überführt und bei -80°C im Nuaire Ultralow Freezer gelagert.

Das Auftauen erfolgte unter sterilen Verhältnissen. Hierzu wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in raumtemperiertem Kulturmedium gewaschen und bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und für die entsprechenden Versuche vorbereitet.

3.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mittels des Zell-Zählgerätes der Firma Schärfe-System.

Vor bzw. nach jedem Versuch wurde das Gerät mit einer Reinigungslösung gereinigt und kalibriert. Für die Zellzählung wurden 50µl der Zellsuspension mit 5ml Casyton-Verdünnungslösung (Firma Schärfe-System) gemischt. Die Auszählung der PBL erfolgte in einer Doppelbestimmung nach definierten Kriterien für Größe und Volumen.

3.5 3H-Thymidin-Proliferationsassay

Da die Patientenproben mehrere Monate kryokonserviert waren, musste zu Beginn der Studie untersucht werden, ob die Zellen noch vital und damit stimulierbar sind bzw. ob die Zellen noch proliferieren können. Der 3H-Thymidineinbau lieferte in diesem Falle ein quantitatives Maß für die DNA-Synthese, die der Zellteilungsrate direkt proportional war. Bei der Zellproliferation kommt es zu einer DNA-Neusynthese. Versetzt man Zellen mit radioaktiv markierten Nukleotiden, so werden diese für die DNA-Synthese verwendet. Die auf diese Weise in die Zellen aufgenommene Radioaktivität kann gemessen werden und die Zellproliferation quantifiziert werden.

Die Versuche wurden je als Doppelbestimmung mit zwei Patientenproben (MUC 52 und 39) und einer Probe mit Spenderlymphozyten durchgeführt. Nach vorsichtigem Auftauen wurden auf eine 96-Loch Platte 2×10^4 Zellen/Loch in 100µl Nährmedium ausgesät. Die Zellen wurden mit 5µg/ml PHA stimuliert. Danach folgte die Zugabe von 10µl eines verdünnten, radioaktiv markierten Thymidins (hierfür wurden 22µl Thymidin mit 1078µl RPMI versetzt). Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 100µl/Loch SDS 0,05% hinzugefügt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem „Cell Harvester“ auf eine Filtermatte übertragen und die über Nacht getrocknete Filtermatte mit Szintillationsgel verschmolzen. Durch die beim Zerfall des radioaktiv markierten Thymidins frei werdende Energie wird das Szintillationsgel zur Emission von Licht angeregt. Dadurch entstehen Lichtblitze, die von einer Fotozelle gezählt werden. Die Messung erfolgte mittels eines Microbeta Counters, welcher die pro Zeiteinheit gemessene Anzahl an Lichtblitzen in „counts per minutes“ (cpm) angibt. Die cpm-Werte geben so eine Auskunft über die Menge der vorhandenen Radionukleotide und somit auch über das Ausmaß der Proliferation.

3.6 IFN γ -ELISPOT-Assay

Grundsätzlich basiert das Prinzip des ELISPOT-Assays auf der Antikörper-vermittelten Visualisierung von Zytokinen. In dieser Arbeit wurde das IFN γ bestimmt, welches von T-Lymphozyten nach entsprechender Stimulierung gebildet und sezerniert wurde. Hierzu wurde auf einer speziellen Filtermembran ein anti-IFN γ -Antikörper fixiert. Nach Zugabe einer entsprechenden Zellsuspension wurde im nächsten Schritt ein zweiter anti-IFN γ -Antikörper hinzugefügt, der zusammen mit den an dem ersten Antikörper gebundenen IFN γ -produzierenden Zellen einen Komplex einging. Nach Zugabe eines Farbindikators (Avidinperoxidase-Komplex) kam es auf der Filtermembran zu einer Farbreaktion, wobei ein Farbstoffpunkt einer IFN γ -produzierenden-Zelle entsprach. Somit erhielt man sowohl eine visuelle Darstellung als auch einen quantitativen Nachweis von IFN γ -produzierenden Zellen. Zur Etablierung wurden zunächst verschiedene Testreihen durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2 und 4.3) und das Protokoll wurde in einigen Fällen modifiziert und auf die zu untersuchenden Proben angepasst. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte für jede eingesetzte Probe eine Dreifachbestimmung.

3.6.1 Etablierung des Versuchsystems mit gesunden Spender-PBL

Im Rahmen der Etablierung gab es im Wesentlichen zwei Fragestellungen. Zum einen sollte herausgefunden werden, welches die ideale Stimulationsdauer ist, zum anderen musste untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen den Stimulanzen PHA *versus* PMA/Ionomycin gibt. Eine quantitative Aussage darüber konnte auch hier mittels der gemessenen Spots gemacht werden. Hierfür wurden die PBL des gesunden Spenders verwendet. Zur Ermittlung der Stimulationsdauer wurden insgesamt drei Versuche durchgeführt (Testreihe I), als Stimulans diente PHA und die Stimulationsdauer betrug 24h, 48h, 72h, 96h und 120h. Zur Ermittlung der Unterschiede zwischen den Stimulanzen PHA und PMA/Ionomycin wurden zwei Versuche durchgeführt (Testreihe II) mit einer Stimulationsdauer von 24h bzw. 48h.

3.6.2 Etablierung des Versuchsystems mit Patientenproben

Grundlegendes Problem bei der Verwendung der Patientenprobe war, dass meist für jeden Zeitpunkt der Blutentnahme nur eine oder wenige Proben zur Verfügung standen. Aus diesem Grunde konnten nur wenige Testreihen durchgeführt werden. Es war zu klären, ob es vorteilhafter war, die Proben für zwei oder für sieben Tage zu stimulieren (Testreihe III). Hierbei wurde sowohl das Wachstum anhand der Zellzahl als auch die IFN γ -Produktion gemessen. Weiterhin bestand auch hier die Frage, ob es Unterschiede PHA *versus* PMA/

Ionomycin gab (Testreihe IV). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Reihenfolge der Gabe von MUC-1 und Stimulans (PMA/ Ionomycin), jeweils mit 24h Stimulationsdauer vor Zugabe des zweiten Agens, einen Einfluss auf die Ergebnisse hat (Testreihe V).

3.6.3 Analyse der Patientenproben

Der Versuch gliederte sich in vier Abschnitte:

Tabelle 3 Versuchsanordnung Teil 1

Abschnitt I	Patientenproben und Spender-Lymphozyten auftauen und für 48h stimulieren
Abschnitt II	96-Loch Nitrocellulose-Platte vorbereiten und für 24h inkubieren
Abschnitt III	Die in Abschnitt II vorbereiteten Platten mit den Zellen aus Abschnitt I bestücken und für 24h inkubieren
Abschnitt IV	Abschluss des Versuches

Zunächst (Abschnitt I) wurden sowohl die Patientenproben als auch die Spender-Lymphozyten aufgetaut, zweimal in Kulturmedium gewaschen und in diesem aufgenommen. Die Zellen wurden daraufhin in eine 24-Loch-Platte auf je 1ml/Loch aufgeteilt. Entsprechend der Versuchsanordnung (Tabelle 3.1) wurden die Versuchsproben 2, 3 und 7 mit PHA 5µg/ml versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 37°C, mit 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Tabelle 3.1 Versuchsanordnung Teil 2

Patientenprobe	Versuchsprobe 1	Medium + Zellen
	Versuchsprobe 2	Medium + Zellen + PHA
	Versuchsprobe 3	Medium + Zellen + PHA (+ MUC-1 Abschnitt III)
	Versuchsprobe 4	Medium + Zellen (+ MUC-1 Abschnitt III)
	Versuchsprobe 5	Medium + Zellen (+ BSA 0,5% Abschnitt III)
Spender-PBL	Versuchsprobe 6	Medium + Zellen
	Versuchsprobe 7	Medium + Zellen + PHA

Danach (Abschnitt II) wurden 96-Loch Nitrocellulose-Platten (Millipore, USA) mit 50µl monoklonalem anti-humanen IFNγ-Antikörper (mAB 1-D1K, Mabtech, Schweden) in einer Konzentration von 10µg/ml PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Als nächstes (Abschnitt III) wurde die über Nacht inkubierte Platte viermal mit 200µl/Loch sterilem PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurde die Platte im Anschluss mit 200µl/Loch RPMI/10% Humanserum für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die in Abschnitt I stimulierten Zellen wurden sechsmal in Assay-Medium gewaschen und anschließend in 1ml Assay-Medium aufgenommen. Die Auszählung erfolgte mittels des Zell-Zählgerätes der Firma Schärfe-System. Im nächsten Schritt wurden in Versuchsprobe 3 und 4 je 5µl/ml des tumorspezifischen MUC-1 Polypeptids hinzugefügt. Die zu untersuchenden Proben wurden in einer Zellkonzentration von 3×10^4 Zellen in 200µl Assay-Medium pro Loch titriert, wobei für jede Versuchsprobe eine Dreifachbestimmung erfolgte. Die Negativkontrolle entsprach Versuchsprobe 5 mit Zusatz von BSA 0,5%. Als Positivkontrolle hinsichtlich der Stimulierbarkeit wurden jeweils Spender-Lymphozyten mit untersucht, entsprechend Versuchsproben 6 und 7. Zusätzlich wurden drei Löcher als Leerprobe nur mit Medium befüllt. Die Platte wurde für 24h bei 37°C mit 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

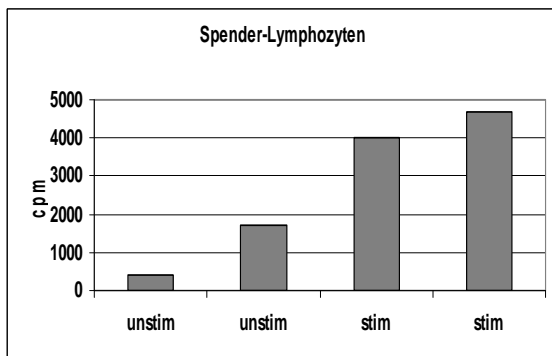
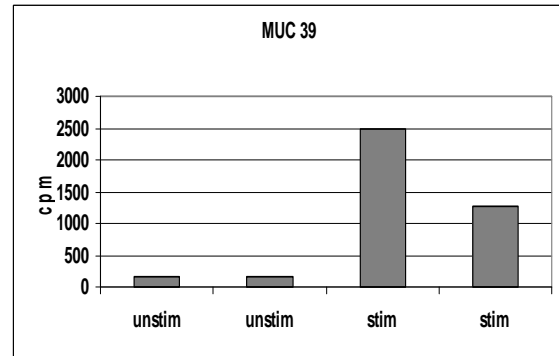
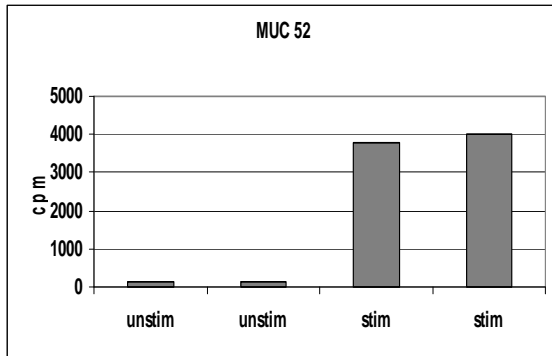
Schließlich (Abschnitt IV) wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween 20) herausgelöst. Je 50µl/Loch eines biotinylierten anti-humanen IFN γ -Antikörpers (mAB 7-B6-1, Mabtech, Schweden) wurden in einer Konzentration von 2µg/ml PBS/BSA 0,5% hinzugefügt und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen wurden in die Platte 100µl/Loch eines Avidin-Peroxidase-Komplexes (je ein Tropfen des Vectastain Elite Kits PK-6100 verdünnt in 10ml PBS/ Tween 20 0,05%) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 sowie darauf folgend mit PBS. Währenddessen wurde eine AEC-Tablette in 2,5ml Dimethylformamide aufgelöst und mit Acetat-Puffer (46,9ml steriles Wasser + 4,6ml Essigsäure + 11ml Natriumacetat) auf 50ml aufgefüllt und 25µl Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Nach steriler Filtration wurden 100µl dieser Lösung in die Vertiefungen gegeben und nach 5 Minuten die sich einstellende Farbreaktion unter fließendem Wasser gestoppt. Die Trocknung der Platten erfolgte unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur. Die Auszählung der Spots wurde mittels Computer-assistierter Video-Analyse am Bioreader 3000 (BioSys, Karben) nach definierten Kriterien für chromatische Dichte, Größe, Zirkulation und Kontrast durchgeführt. Von den Triplikaten wurden jeweils die Mittelwerte berechnet. Die Auswertung wurde immer von derselben Person durchgenommen, um mögliche Unterschiede in der Interpretation der Spots zu vermeiden.

3.7 Statistische Methoden

Es wurden verschiedene Wilcoxon-Rang-Tests für gepaarte Stichproben angewendet, um mögliche Unterschiede in den Medianwerten darzustellen. Da von einer Normalverteilung der Daten nicht ausgegangen werden konnte, kam ein nicht-parametrischer Wilcoxon-Test eher in Frage, als der t-Test. Bezüglich des Zellwachstums wurden die Zellen allein (kultiviert nur in Medium), mit Zellen und BSA-Zusatz verglichen, sowie Zellen allein und Zellen aktiviert mit PHA. Bezüglich der $\text{INF}\gamma$ -Messung wurde ein Vergleich gezogen zwischen Zellen allein gegenüber Zellen mit BSA-Zusatz, Zellen aktiviert mit PHA und Zellen aktiviert mittels MUC-1 Polypeptid. Da die Anzahl der gemessenen Werte sehr klein war, kamen exakte Tests anstelle von asymptotischen Tests zur Anwendung. Die Auswertung erfolgte mit einem exakten Wilcoxon-Test des statistischen Programms R, welches einen exakten Rangtest von Torsten Hothorn und Kurt Hornik beinhaltet. Hierbei berechnet man exakte p-Werte für die möglicherweise gebundenen Daten des Shift-Algorithmus von Streitberg und Röhmel. Da es das Ziel dieser Studie war, Unterschiede in Zellwachstum und/oder $\text{INF}\gamma$ -Produktion zu zeigen, wurden die Tests einseitig durchgeführt. Der Wilcoxon-Rang-Test kann nur sinnvoll angewendet werden, wenn die Stichprobe größer als vier ist. Daher konnte der Test zu den Zeitpunkten II, VII, XII und XIII wegen Mangel an Daten nicht durchgeführt werden. Zusätzlich sind Anpassungen für multiple Testungen mittels der Simes-Hochberg Methode angewendet worden. Für alle Tests galt ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$, die Boxplots wurden mit Hilfe des statistischen Programms SPSS erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des 3H-Thymidin-Proliferationsassays



Zusammenfassung:

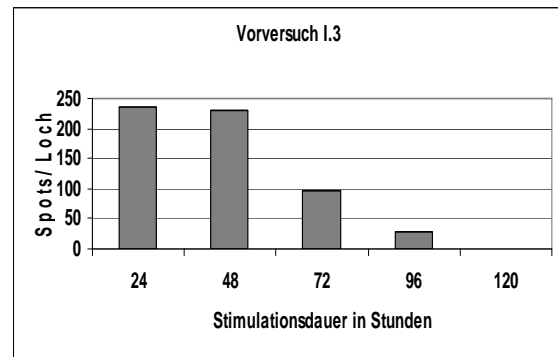
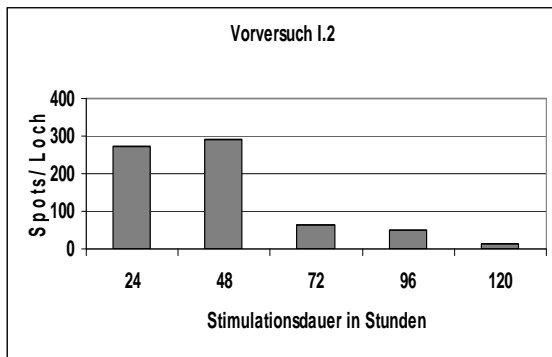
Die Histogramme zeigen jeweils zwei Versuchsreihen von zwei Patientenproben (MUC 52 bzw. MUC 39) und im Vergleich die Ergebnisse zweier Versuchsreihen der Spender-Lymphozyten. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus einer Achtfachbestimmung. Als Stimulans diente PHA 5µg/ml. Vergleicht man die unstimulierten Zellen mit den stimulierten Zellen so kam es sowohl bei den Patientenproben als auch bei den Spender-Lymphozyten zu einer Zunahme der counts per minutes (cpm) und damit zu einer deutlichen Proliferation.

4.2 Ergebnisse der Etablierung des Versuchsystems mit gesunden Spender-PBL

4.2.1 Testreihe I: Ermittlung der Stimulationsdauer

Tabelle 4 Ergebnisse des IFN γ ELISPOTs (Mittelwerte)

Stimulationsdauer in Stunden	Vorversuch I.1		Vorversuch I.2		Vorversuch I.3	
	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
24	8	313	4	271	5	236
48	5	321	9	289	5	230
72	5	99	4	65	7	98
96			7	48	13	29
120	7	75	7	15		



Zusammenfassung:

Stimulierte PBL sezernierten mehr IFN γ . Allerdings zeigte sich ein deutlicher Rückgang der IFN γ -Produktion nach 72 Stunden. Zur Veranschaulichung dienen exemplarisch die Balkendiagramme (Vorversuch I.2-3), in denen die Spots der stimulierten Proben gegenüber der Stimulationsdauer in Stunden aufgetragen sind.

4.2.2 Testreihe II: Ermittlung der Unterschiede zwischen PHA und PMA/Ionomycin

Tabelle 5 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Stimulationsdauer in Stunden	Vorversuch II.1		Vorversuch II.2	
	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
24 mit PHA	20	306	25	312
24 mit PMA/ Ionomycin	4	342	9	317
48 PHA	8	256	13	264
48 PMA/ Ionomycin	24	342	30	325

Zusammenfassung:

Es konnte gezeigt werden, dass es bei beiden Stimulanzen zu beiden Zeitpunkten zu einer vermehrten IFN γ -Produktion gekommen ist. Der Unterschied zwischen PHA und PMA/Ionomycin war nicht erheblich, dass heißt beide Stimulanzen hätten eingesetzt werden können. Wir haben PHA als Stimulans ausgewählt.

4.3 Ergebnisse der Etablierung des Versuchsystems mit Patienten-PBL

4.3.1 Testreihe III: Ermittlung der Stimulationsdauer

Tabelle 6 Patient MUC 48 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6	8,5	9,5	11	10,5		
IV	11,5	10,5	8,5	12,5	5,5		
VI	7	8,5	10	10,5	6,5		
VII	10	7	7	7,5	7,5		
IX	9,5	8	9	7	5		
X	5	6,5	10	5,5	7		
XI	8,5	6,5	8	8,5	6,5		
Spender-PBL						7	17

Tabelle 6.1 Patient MUC 48 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	3	5	9	3	6		
IV	15	10	13	17	10		
VI	15	9	17	15	11		
VII	15	18	19	14	11		
IX	11	17	13	12	10		
X	0	1	3	10	6		
XI	7	9	8	7	8		
Spender-PBL						15	20
Medium						4	

Tabelle 7 Patient MUC 50 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	10	5	9,5	11,5	11,5		
III	7,5	9	12,5	13	6		
IV	9	7,5	9,5	9,5	8		
V	9	14	17	18,5	13,5		
VI	9,5	12	13,5	9,5	13		
VIII	12,5	9,5	12	7,5	8,5		
IX	7	10,5	9	9,5	5,5		
X	6	9,5	9	7,5	10		
Spender-PBL						11,5	17

Tabelle 7.1 Patient MUC 50 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	5	4	13	10	6		
III	13	16	13	13	13		
IV	13	13	11	8	9		
V	10	15	14	9	8		
VI	9	15	13	14	9		
VIII	11	5	16	12	11		
IX	6	14	16	21	12		
X	14	9	18	13	17		
Spender-PBL						14	26
Medium						4	

Tabelle 8 Patient MUC 52 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	4,5	5,5	5,5	6,5	5		
II	7	7	6,5	9	5		
III	7,5	10,5	10	4	9		
IV	6,5	7	7,5	7	6		
V	6	6,5	11,5	11	8		
VI	6,5	8	10,5	12	6,5		
IX	6	7,5	8,5	4,5	6		
X	7	6	6	12,5	8		
XI	10	5,5	9	9	9,5		
Spender-PBL						8,5	12

Tabelle 8.1 Patient MUC 52 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6	6	12	8	10		
II	8	15	6	10	11		
III	11	10	5	6	13		
IV	9	5	11	10	10		
V	5	13	16	9	5		
VI	4	2	6	9	7		
IX	9	11	15	13	10		
X	19	16	16	15	14		
XI	18	27	19	19	18		
Spender-PBL Medium						17 3	26

Zusammenfassung:

Für diesen Versuch wurden drei Patientenproben (MUC 48, 50, 52) sieben Tage lang stimuliert, danach wurde, dem Protokoll entsprechend, der Versuch durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, ob es von Vorteil wäre, die Zellen länger als zwei Tage zu stimulieren. Vergleicht man nun die Werte aus diesem Versuch mit denen aus den Versuchen in Abschnitt 4.4 „Ergebnisse der Analyse der Patientenproben“ (Tabelle 20, 20.1; Tabelle 21, 21.1; 22, 22.1), so zeigten sich keine gravierenden Unterschiede bei der Zellzahlbestimmung. Der Vergleich der IFN γ -Produktion zwischen den stimulierten Proben 2 und 3 bzw. der Probe 4 durch Zugabe des MUC-I Peptides ergab auch hier keine deutlichen Unterschiede zu den Ergebnissen in Abschnitt 4.4. „Ergebnisse der Analysen der Patientenproben“. Einen geringen Unterschied gab es bei den unstimulierten Proben 1 und 5. Deutlich zu erkennen war aber, dass die Spots bei den gesunden Spender-Lymphozyten abnahmen, dargestellt in Tabelle 8.2.

Tabelle 8.2 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Spender-PBL aus Versuch mit Pat.-Proben	2 Tage Stimulation		7 Tage Stimulation	
	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
MUC 48	16	53	15	20
MUC 50	10	81	14	26
MUC 52	17	126	17	26

4.3.2 Testreihe IV: Ermittlung der Unterschiede zwischen PHA und PMA/Ionomycin

Tabelle 9 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patient	2d		7d	
	unstimuliert	stimuliert PHA	unstimuliert	stimuliert PHA
MUC 48	6	23	3	5
MUC 50	10	25	7	11
MUC 52	23	62	14	36
MUC 52	unstimuliert	stimuliert PMA	unstimuliert	stimuliert PMA
	14	26	2	6

Zusammenfassung:

Wie aus den Werten hervorgeht, kam es durch beide Stimulanzien zu einer Zunahme der IFN γ -Produktion. Vergleicht man die Stimulation nach zwei Tagen, so gab es zwischen PHA und PMA/Ionomycin keine deutlichen Unterschiede. Jedoch konnte auch hier gezeigt werden, dass nach sieben Tagen die Spots abnahmen.

4.3.3 Testreihe V

Tabelle 10 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Leer	Kontrolle	PMA	PMA+MUC	PMA+MUC (2.d)	MUC-1	MUC-1+ (PMA 2.d)
MUC 15	8	14	26	21	19	20	14

Zusammenfassung:

Der Versuch ergab, dass es sowohl durch das Stimulans (PMA/Ionomycin) als auch durch die Zugabe des MUC-1 Polypeptides am selben bzw. folgenden Tag zu einer Zunahme der Spots kam. Auch das MUC-1 Peptid alleine bewirkte eine vermehrte IFN γ -Produktion. In der letzten Versuchsanordnung mit MUC-1 + PMA/Ionomycin kam es am zweiten Tag zu keiner deutlichen Veränderung.

4.4 Ergebnisse der Analyse der Patientenproben

Erläuterung der Tabellen:

Insgesamt wurden zwölf Patienten untersucht, bezeichnet mit MUC 30-52. Die Patientenproben, gekennzeichnet mit den römischen Ziffern I-XIII entsprachen den Zeitpunkten der Blutabnahme:

I	Präoperativ.
II	Am OP-Tag
III	1 Monat postop.
IV	2 Monate postop.
V	3 Monate postop.
VI	4 Monate postop.
VII	5 Monate postop.
VIII	6 Monate postop.
IX	9 Monate postop.
X	12 Monate postop.
XI	15 Monate postop.
XII	18 Monate postop.
XIII	24 Monate postop.

Proben 1-5 entsprachen folgender Versuchsprobenanordnung (vgl. Tabelle 3 und 3.1. siehe Kapitel 3.6.3):

Probe 1	Medium + Zellen
Probe 2	Medium + Zellen + PHA
Probe 3	Medium + Zellen + PHA (+ MUC-1 Abschnitt III)
Probe 4	Medium + Zellen (+ MUC-1 Abschnitt III)
Probe 5	Medium + Zellen (+ BSA 0,5% Abschnitt III)
unstimuliert	Medium + Zellen
stimuliert	Medium + Zellen + PHA

Als Stimulans diente PHA, die Stimulationsdauer betrug 48 Stunden.

Aufgetragen in den Tabellen sind jeweils die Mittelwerte der gemessenen Triplikate.

Tabelle 11 Patient MUC 30 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
II	8	13	16	12,5	9		
III	9,5	11,5	15,5	10,5	11		
IV	9	16,5	13,5	11,5	12		
V	8,5	13,5	15	10	10		
VII	10	17,5	14,5	11,5	9		
VIII	12,5	15,5	13,5	11	12		
IX	14,5	16,5	17,5	12	11,5		
Spender-PBL						13,5	15

Tabelle 11.1 Patient MUC 30 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
II	4	6	5	10	5		
III	6	16	12	11	8		
IV	17	19	13	19	14		

V	17	18	19	24	18		
VII	5	6	11	13	5		
VIII	21	17	15	10	14		
IX	14	17	10	15	13		
Spender-PBL Medium						15 5	25

Tabelle 12 Patient MUC 34 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	10,5	13,5	12	16	10,5		
III	13	16,5	13,5	10	8		
IV	14,5	16	14,5	11	10,5		
V	11	13,5	17,5	15	11,5		
VI	8,5	12	15	10	10		
VIII	9	12	12,5	10	11,5		
IX	8	13	13,5	12	11,5		
X	12	15,5	18,5	9	10		
XII	12,5	15,5	12	13,5	10		
Spender-PBL						14,5	17

Tabelle 12.1 Patient MUC 34 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	7	12	9	9	4		
III	7	9	13	10	8		
IV	11	13	11	9	10		
V	10	6	6	13	10		
VI	6	9	15	17	6		
VIII	10	18	10	6	6		
IX	3	4	4	10	4		
X	4	11	16	7	4		
XII	13	15	14	15	11		
Spender-PBL Medium						14 4	85

Tabelle 13 Patient MUC 37 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	14,5	17	17,5	17,5	15,5		
III	15,5	17	16	19	17		
V	12	16	21,5	17	15,5		
VIII	13,5	19	22	14,5	14		
IX	13,5	15	14,5	17	14,5		
X	15	18	17,5	12	12		
XII	13,5	17	19	19	15		
Spender-PBL						16,5	19

Tabelle 13.1 Patient MUC 37 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	4	9	8	13	4		
III	7	12	13	11	9		
V	11	17	12	13	12		
VIII	11	12	16	10	13		
IX	6	6	10	15	7		
X	11	16	17	11	12		
XII	14	16	9	14	18		
Spender-PBL Medium						14 5	39

Tabelle 14 Patient MUC 39 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	13,5	15,5	18,5	17	15		
III	15,5	20	15,5	15,5	15,5		
V	12,5	22,5	17,5	14,5	13,5		
VIII	9,5	13,5	14,5	9	8,5		
IX	13,5	17,5	17,5	11	14,5		
X	19,5	23	22	16,5	11		
XII	11,5	14	20	16,5	13		
Spender-PBL						22,5	27

Tabelle 14.1 Patient MUC 39 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	9	10	11	15	8		
III	13	19	19	14	10		
V	13	17	15	15	9		
VIII	12	14	10	19	12		
IX	8	10	16	18	8		
X	7	21	17	14	9		
XII	22	17	12	9	12		
Spender-PBL						15	40
Medium						6	

Tabelle 15 Patient MUC 41 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	8,5	11,5	9,5	12	8,5		
III	16	29	24	18	16		
IV	11,5	14	11	8	9,5		
V	7	13,5	17,5	15	12,5		
VI	13,5	13	14,5	13	14		
VIII	19	20,5	17,5	19	18,5		
IX	16,5	18,5	18,5	20	16		
X	14,5	19	17	16	15,5		
Spender-PBL						17	19,5

Tabelle 15.1 Patient MUC 41 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6	7	7	18	6		
III	5	15	16	7	6		
IV	7	9	10	13	11		
V	7	23	6	13	8		
VI	4	3	4	10	8		
VIII	5	13	13	10	7		
IX	14	16	8	19	16		
X	14	17	20	21	15		
Spender-PBL						20	35
Medium						5	

Tabelle 16 Patient MUC 42 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	14,5	17	16	10,5	14,5		
III	14	14,5	14	11,5	13,5		
V	12,5	14	14,5	16	12,5		
VIII	13	17,5	18	18,5	13		
X	18,5	22	18	17	13		
XI	12	20,5	20	19,5	16		

Spender-PBL						18,5	26,5
-------------	--	--	--	--	--	------	------

Tabelle 16.1 Patient MUC 42 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	7	10	5	15	3		
III	8	20	21	9	11		
V	16	17	12	11	11		
VIII	13	19	10	22	12		
X	20	22	22	15	16		
XI	17	26	19	12	15		
Spender-PBL						7	26
Medium						4	

Tabelle 17 Patient MUC 43 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	11,5	13,5	14	11,5	12,5		
IV	10,5	8,5	10,5	8	12		
VI	7,5	10,5	11,5	10	9,5		
VIII	9,5	11	8	10,5	10,5		
IX	11	13,5	10,5	11,5	11		
X	10	9	10	12	13,5		
XI	9,5	11,5	12	11,5	10		
Spender-PBL						11,5	14

Tabelle 17.1 Patient MUC 43 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	8	12	24	20	9		
IV	19	21	21	22	15		
VI	16	24	22	21	13		
VIII	16	30	20	18	18		
IX	7	8	19	16	7		
X	22	15	10	20	14		
XI	15	18	25	19	14		
Spender-PBL						21	84
Medium						5	

Tabelle 18 Patient MUC 46 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
III	5,5	7,5	7	5,5	4,5		
IV	8	9	9	6,5	7		
V	8	7,5	8	6,5	6,5		
VI	6,5	7,5	9	7	7,5		
VIII	5	8	8	4,5	5,5		
IX	6	8	9	7	7		
X	6,5	8,5	6	9,5	7		
XII	6,5	8,5	6	9,5	7		
XIII	11	16	17,5	12	11		
Spender-PBL						11	13,5

Tabelle 18.1 Patient MUC 46 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
III	5	4	6	6	5		
IV	6	8	14	11	7		
V	13	17	13	15	12		
VI	8	14	13	15	9		
VIII	17	7	14	4	8		
IX	6	17	6	7	4		
X	8	11	10	12	10		

XII	19	22	18	14	13		
XIII	12	20	11	11	5		
Spender-PBL						8	41
Medium						5	

Tabelle 19 Patient MUC 47 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6,5	9	11	7,5	8		
II	8	9	10,5	8	6		
III	6	8,5	9	8,5	7,5		
IV	9	11	11	10,5	10		
V	9,5	11	8,5	12,5	8		
VII	8,5	9	10,5	8,5	9,5		
XI	8,5	12,5	9	9,5	5		
XIII	9	11	11	8,5	9,5		
Spender-PBL						8	12

Tabelle 19.1 Patient MUC 47 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	3	5	6	9	5		
II	6	13	12	9	6		
III	5	10	11	15	9		
IV	11	17	17	9	7		
V	15	11	12	6	10		
VII	10	13	6	11	9		
XI	8	7	9	7	10		
XIII	6	17	13	7	5		
Spender-PBL						20	49
Medium						4	

Tabelle 20 Patient MUC 48 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert x10⁵/ml)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	5,5	7	6	6	7		
IV	7,5	7,5	8,5	6,5	8,5		
VI	6,5	9	9	9,5	8		
VII	11,5	16	17,5	9	9		
IX	6,5	8,5	4,5	11,5	7,5		
X	8	10,5	10,5	10	9,5		
XI	10	14	13,5	6,5	9,5		
Spender-PBL						10	15

Tabelle 20.1 Patient MUC 48 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6	14	15	10	7		
IV	14	13	10	11	13		
VI	9	15	14	15	10		
VII	12	23	17	11	11		
IX	23	19	4	9	19		
X	4	5	9	10	7		
XI	10	15	14	12	8		
Spender-PBL						16	53
Medium						4	

Tabelle 21 Patient MUC 50 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	6,5	8,5	8	5,5	7,5		
III	12	13	11	10	11		
IV	8,5	12	13,5	10,5	10		
V	12,5	17,5	17,5	15,5	13		
VI	10	14	16,5	14,5	11,5		
VIII	15,5	15	11	16,5	14		
IX	11	14,5	14	12	12		
X	13	18,5	10	11	12,5		
Spender-PBL						13,5	15,5

Tabelle 21.1 Patient MUC 50 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	4	6	10	6	5		
III	8	9	5	10	9		
IV	8	10	12	14	8		
V	8	12	15	11	7		
VI	6	15	18	7	8		
VIII	7	6	6	7	9		
IX	7	20	14	8	9		
X	17	17	12	13	10		
Spender-PBL						10	81
Medium						6	

Tabelle 22 Patient MUC 52 Ergebnisse der Zellzählung (Mittelwert $\times 10^5/\text{ml}$)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	7,5	8	10,5	8,5	6,5		
II	3	5,5	5,5	2,5	5,5		
III	4,5	8,5	16	3,5	4,5		
IV	6,5	13,5	8,5	8	7		
V	6,5	15	11,5	10,5	9,5		
VI	7,5	11	9,5	9,5	9		
IX	5,5	8	10,5	4,5	4		
X	7	9	9	8	7		
XI	5	12,5	14,5	7	8,5		
Spender-PBL						8	13

Tabelle 22.1 Patient MUC 52 Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs (Mittelwerte)

Patientenprobe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	unstimuliert	stimuliert
I	3	5	8	9	5		
II	11	14	12	14	8		
III	12	13	10	10	7		
IV	12	13	14	8	10		
V	11	13	14	15	8		
VI	1	2	4	9	6		
IX	3	6	12	13	5		
X	10	14	11	15	6		
XI	15	13	22	8	8		
Spender-PBL						17	126
Medium						4	

Fig. 1: Cell Growth

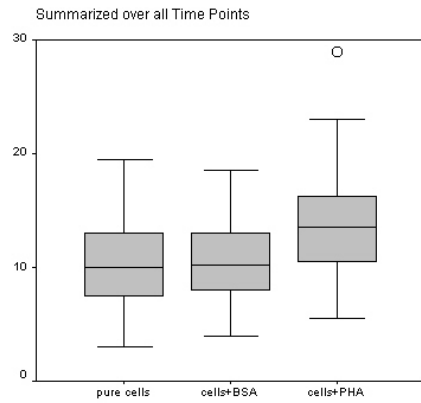


Abbildung 1 Zellwachstumszählung zusammengefasst

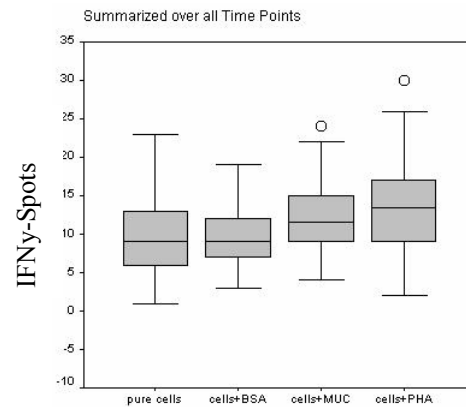
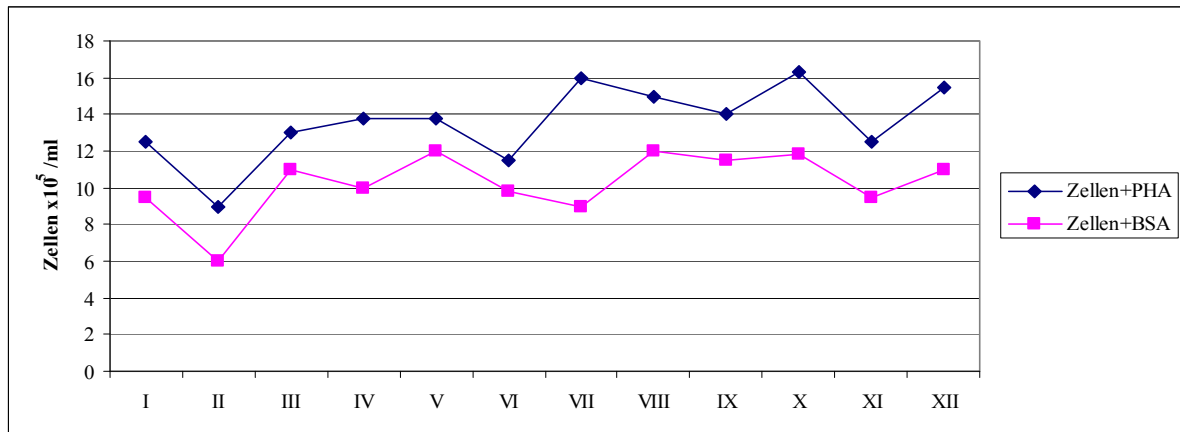
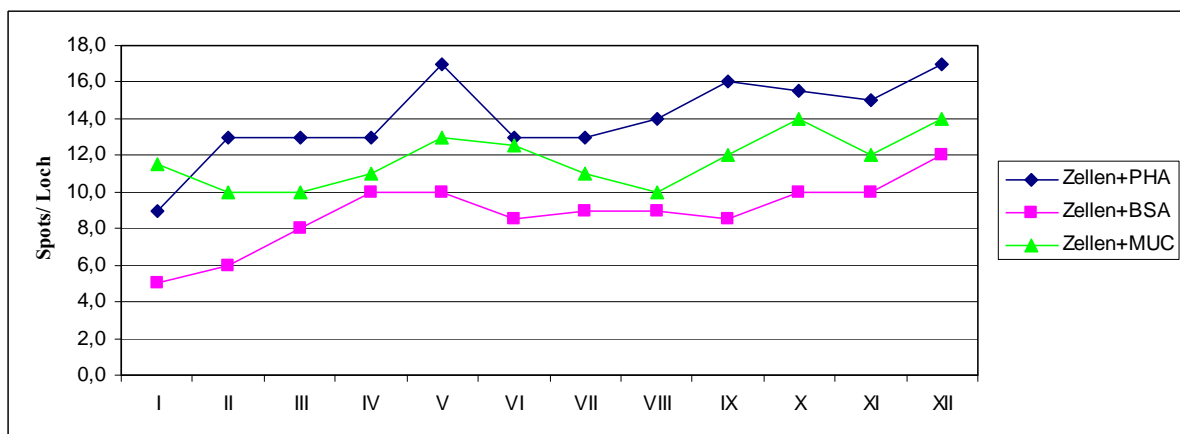
Abbildung 2 IFN γ -Produktion zusammengefasst

Abbildung 1.1 Zellzählung zu den Zeitpunkten der Blutprobenentnahme.

Gemittelte Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen (I-XII). Zeitpunkt XIII aufgrund zu geringer Messdaten nicht eingezeichnet.

Abbildung 2.1 IFN γ -Produktion zu den Zeitpunkten der Blutprobenentnahme. Ergebnisse des ELISPOT.

Gemittelte Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen (I-XII). Zeitpunkt XIII aufgrund zu wenig Messdaten nicht eingezeichnet

Zusammenfassung:

Es wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen Proben vom Beginn, der Mitte und vom Ende der Studie zur Verfügung standen. Bezüglich des Zellwachstums ergaben die Analysen, dass die Zellen durch die Stimulation mit PHA in geringem Maße wuchsen, somit also trotz der Lagerung noch proliferationsfähig waren. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 1 Box-Plots aufgetragen, die einen zusammenfassenden Überblick aller Proben liefern hinsichtlich des Wachstums von Zellen allein und Zellen versetzt mit BSA-Zusatz bzw. aktiviert mit PHA. Abbildung 1.1 veranschaulicht die gemittelten Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen. In Abbildung 2 sind die Box-Plots aufgetragen, die einen Aufschluss über die IFN γ -Produktion geben. Hier ist zu erkennen, dass die Zellen sowohl durch das tumorspezifische MUC-1 Polypeptid als auch durch die Stimulation mit PHA im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. den Zellen ohne Zusatz mehr IFN γ sezernierten. Abbildung 2.1 veranschaulichen die gemittelten Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen. In allen Versuchen war die Zytokinsekretion bei den gesunden Spenderzellen im Vergleich mit den Patientenproben stärker ausgeprägt. Zur Veranschaulichung dienen folgende Abbildungen:

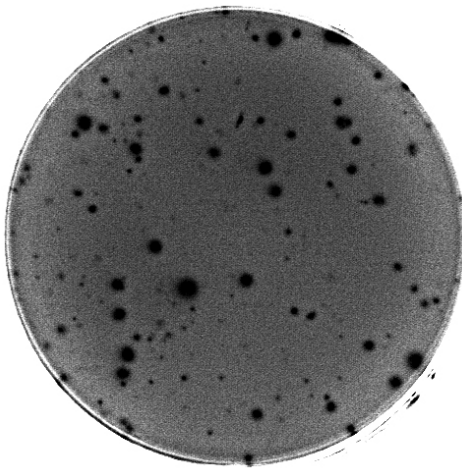


Abbildung 3

Repräsentative Aufnahme des ELISPOTs.
Spender-Probe stimuliert mit PHA 5 μ g/ml

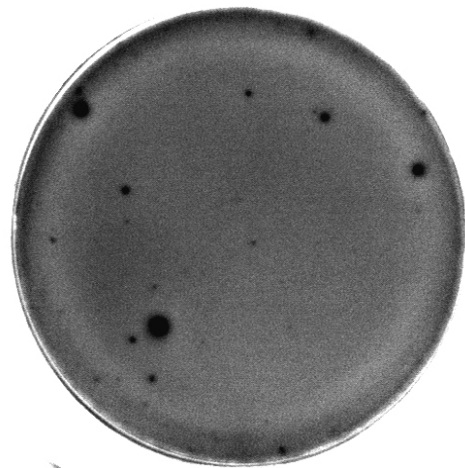


Abbildung 4

Repräsentative Aufnahme des ELISPOTs.
Patienten-Probe stimuliert mit PHA 5 μ g/ml

4.5 Ergebnisse der statistischen Methoden

4.5.1 Zellwachstum

Abbildung 5 (siehe Anhang) zeigt die Ergebnisse der Analysen der Patientenproben, hinsichtlich des Zellwachstums für Zellen allein, Zellen mit BSA-Zusatz und Zellen aktiviert mit PHA. Die Box-Plots illustrieren die zusammengefassten Messdaten zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutprobengewinnung. Es ist ersichtlich, dass der Unterschied im Wachstum von Zellen allein und Zellen mit BSA sehr gering war. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Dies spiegelte sich in den Ergebnissen der durchgeführten Tests wieder. Zu den Zeitpunkten I und VI wichen die Mediane der Zellen mit BSA-Zusatz signifikant voneinander ab, jedoch war der Unterschied nach der Anpassung mittels der Simes-Hochberg Methode nicht mehr vorhanden. Das Zellwachstum der Zellen plus PHA war beträchtlich höher als das der Zellen allein. Zu allen Zeitpunkten war der Unterschied der Mediane signifikant, auch nach der Anpassung mittels der Simes-Hochberg Methode.

4.5.2 IFN γ -Produktion

In Abbildung 6 (siehe Anhang) sind die Messergebnisse der IFN γ -Spotanalyse für die Zellen allein, Zellen mit BSA-Zusatz, Zellen aktiviert mit MUC-1 und Zellen aktiviert mit PHA veranschaulicht. Die Box-Plots illustrieren wiederum die zusammengefassten Messdaten zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutprobengewinnung. Auch hier bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Messdaten der Zellen allein und Zellen mit BSA-Zusatz. Der Unterschied zwischen den Zellen allein und Zellen aktiviert mit MUC-1 war zum Zeitpunkt I, III und VI signifikant, nach Adjustierung blieb dies für Zeitpunkt I erhalten. Die größten Unterschiede gab es zwischen den Zellen allein und den Zellen aktiviert mit PHA. Zu den Zeitpunkten I, III, IV, VI, IX und X war dieser signifikant. Nach Adjustierung traf dies für die Zeitpunkte I und IV ebenso zu.

Die IFN γ -Produktion der Zellen mit PHA und MUC-1 war im Vergleich zu den Zellen allein und Zellen mit BSA-Zusatz zwar erhöht, die Werte lagen aber leicht unter denen der PHA-aktivierten Zellen. Da die Ergebnisse starke Schwankungen zeigten, wurden sie im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Auch brachte dieser Ansatz keine zusätzlichen Informationen und es waren keine additiven Effekte vorhanden.

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob die Vakzinierung im Rahmen einer klinischen MUC-1-Peptidvakzinestudie einen Einfluss auf die zelluläre Immunität hat. Hierzu wurde die IFN γ -Konzentration in den isolierten T-Zellen mittels ELISPOT-Analyse bestimmt. Die Zellen sowohl mit dem unspezifischen Stimulans PHA, als auch mit dem tumorspezifischen MUC-1 Polypeptid stimuliert. Einerseits sollte dadurch bestimmt werden, ob die Zellen noch stimulierbar sind, andererseits, ob eine Spezifität gegenüber MUC-1 besteht, die sich in einer erhöhten IFN γ -Produktion widerspiegelt.

Wir haben die peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) von insgesamt zwölf Pankreaskarzinompatienten untersucht, welche mit einem tumorspezifischen MUC-1 Polypeptid sowie dem Adjuvans SB-AS-2 vakziniert wurden. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass man die Immunogenität von synthetischen Peptiden steigern kann, indem man sie zusammen mit Adjuvantien appliziert. Für das hier verwendete SB-AS-2 ist berichtet worden, dass es sich um einen potenten Induktor der zellulären und humoralen Immunantwort handelt [57, 58]. Der Einfluss von MUC-1 sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene ist bedeutend und konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden. Diverse Studien haben sich mit dem Einfluss von MUC-1 auf das Immunsystem und auf die T-Zellen samt deren Aktivierung befasst. Goydos et al. [41] sowie Ramanathan et al. [42] zeigten, dass es bei Karzinompatienten nach Vakzinierung mit einem tumorspezifischen MUC-1 Polypeptid, versetzt mit einem Adjuvans, zu einer starken T-Zellinfiltration in Hautstanzen sowie zu einem Anstieg von muzinspezifischen CTL kommt. Weiterhin konnte auch eine Erhöhung der IgG- bzw. IgM-Konzentrationen beobachtet werden. Musselli et al. [43] untersuchten Brustkrebspatienten. Auch hier kam es nach Vakzinierung mit MUC-1 zu einem Anstieg von IgG und IgM.

Des Weiteren war zu klären, in wie weit das MUC-1 die Zytokinproduktion beeinflusst. Für das IFN γ ist beschrieben, dass es mit der spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Zytotoxizität korreliert. Weiterhin kann sich IFN γ als proinflammatorisches Zytokin positiv auf das Überleben der Patienten bei verschiedenen Karzinomen, so auch beim Pankreaskarzinom, auswirken [54-56, 45]. Zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass CTL nach Vakzinierung mittels MUC-1 mehr IFN γ sezernierten [42, 44, 45]. Sivinski et al. [59] untersuchten den Einfluss auf MUC-1 exprimierende

Pankreastumoren nach Vakzinierung mittels MUC-1 und machten deutlich, dass die CTL, aber vor allem IFN γ essentiell für die Eliminierung solcher Tumoren sind. Ding et al. sowie Mukherjee et al. [60, 61] konnten dies in einem Tiermodell bestätigen: Immunisierte Mäuse bildeten im Vergleich zu unbehandelten Tieren vermehrt T-Zellen, welche IFN γ sezernierten und zytotoxisch gegen MUC-1 exprimierende Tumoren wirkten.

Für die Zytokinbestimmung stehen mehrere unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Der ELISA beispielsweise wird häufig angewendet, um eine T-Zellantwort auf ein Antigenepitop zu messen. Allerdings besteht bei diesem System das Problem, dass man zwar eine Immunantwort detektieren, aber nicht die Anzahl der Zellen quantifizieren kann, welche gegen einen Stimulus funktionell reagieren. Asai et al. [62] zeigten in ihrer Arbeit, dass der ELISPOT für die Bestimmung der Zytokinsekretion eine gute und sehr sensitive Methode darstellte. Bestätigen konnten dies weitere Studien [63-65]. Asai et al. verglichen weitere Untersuchungsmöglichkeiten, wie den Limiting-Dilution Assay (LDA), der ihrer Meinung nach eine gute Methode für die Erforschung von spezifischen T-Zellen darstellt. Allerdings bietet der ELISPOT auch hier einige Vorteile: Bei einer großen Anzahl an Proben ist der LDA sehr komplex und arbeitsaufwendig. Vor allem, wenn man die T-Zellantwort zwischen mehreren Proben vergleichen möchte, kann der Informationsgewinn sehr gering sein. Weiterhin wurde darauf hingewiesen, dass für den LDA in vielen Studien virale Antigene verwendet wurden, die eine starke Immunantwort hervorriefen. Verwendet man aber, wie in unserem Fall, Tumorantigen, so kann es schwieriger sein, mit dem LDA eine Immunantwort zu quantifizieren. Eine Begründung hierfür könnte die tumorinduzierte Immunsuppression sein, welche die T-Zellproliferation und/oder die Zytokinproduktion [42] schmälern.

Mit dem ELISPOT lassen sich Immunantworten auf zellulärer Ebene dann deutlich sensitiver nachweisen. Daher gewinnt der ELISPOT immer mehr an Bedeutung in der Tumorforschung. Zu Anfang steht dabei die Etablierung eines individuell auf das Untersuchungsmaterial abgestimmten Protokolls.

5.1 Etablierung des Versuchsystems

Für diese Arbeit musste ein ELISPOT etabliert werden, der eine hohe Spezifität aufwies, leicht durchzuführen war und verlässliche Ergebnisse lieferte. Insbesondere die Durchführbarkeit war ein wichtiger Punkt, da pro Patient viele einzelne Untersuchungsproben vorhanden waren und die einzelnen Teilschritte zu exakt vorgeschriebenen Zeitpunkten durchgeführt werden mussten.

Da wie beschrieben die Proben der Patienten für einen langen Zeitraum kryokonserviert waren und man auch nicht abschätzen konnte, wie vital die Zellen noch waren, musste zuerst die Stimulierbarkeit bzw. die Fähigkeit zur Proliferation bestimmt werden. Der 3H-Thymidin-Proliferationsassay wurde hierfür als Standardmethode [66] eingesetzt, indem er eine Aussage über die Zellteilungsrate lieferte. Die Ergebnisse der Patientenproben zeigten eine Zunahme um das 10 bis 30 fache der cpm-Werte nach Stimulation mit PHA (MUC 39 unstimuliert 166/164 cpm, stimuliert 2481/1277cpm; MUC 52 unstimuliert 118/129 cpm, stimuliert 3796/3989 cpm). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Proben trotz der Lagerungsbedingungen und des Tumorleidens der Patienten durchaus noch vital und proliferationsfähig waren.

Danach folgten die Testreihen für die Bestimmung der Stimulationsdauer. Aus den Ergebnissen mit gesunden Spender-Lymphozyten ging hervor, dass die stimulierten Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden vermehrt IFN γ sezernierten, allerdings nahmen die Spots nach 72 Stunden deutlich ab, daher gingen wir von einer optimalen Stimulationsdauer von 48 Stunden aus. Die Arbeitsgruppe um Malyguine et al. [67] etablierten in ihrer Studie ein IFN γ -ELISPOT bei Lymphompatienten vor bzw. nach Vakzinierung und untersuchten unter anderem auch die Stimulationsdauer. Sie kamen zu ähnlichen Ergebnissen, indem sie zeigten, dass nach 48 Stunden gegenüber 24 Stunden mehr IFN γ produziert wurde und eine Stimulierung von 72 Stunden zu keiner weiteren Steigerung der IFN γ führte. Eine andere Arbeit von Venkataraman [53] konnte diese Beobachtungen ebenfalls bestätigen, auch hier produzierten die PHA-stimulierten PBMCs nach 48 Stunden gegenüber 24 Stunden mehr IFN γ . Zu kontroversen Ergebnissen kamen Godoy-Ramirez et al. [68], sie verzeichneten die höchste Konzentration nach 72 Stunden.

Da für diese Arbeit Zellen von Pankreaskarzinompatienten verwendet wurden, musste die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass solche Zellen sich unter Umständen gegenüber gesunden Zellen durch eine eingeschränkten Aktivierbarkeit und Zytokinproduktion

unterscheiden könnten. Diese Eigenschaft untersuchten Schmielau et al. [69, 70] und wiesen eine deutlich verminderte Zytokinproduktion nach.

Uns stellte sich nun die Frage, ob es günstig wäre, wenn man die Patientenproben für einen längeren Zeitraum kultivierte bzw. stimulieren würde. Die Ergebnisse des Stimulierungsversuches mit den Patientenproben für sieben Tage ergaben im Vergleich mit der Stimulation für 48 Stunden aber weder einen Anstieg in der Zellzahl noch eine deutlich vermehrte IFN γ -Produktion, so dass auf eine längere Stimulationsdauer verzichtet werden konnte.

In der Vielzahl der verwendeten ELISPOT-Methoden wurden unterschiedliche Stimulanzen verwendet, wobei vermehrt PHA bzw. PMA/Ionomycin eingesetzt wurden. Beide stimulieren die Lymphozyten unspezifisch und steigern die Zytokinsekretion. Durch die Testphasen II und IV wollten wir klären, ob es einen Unterschied zwischen den beiden Stimulanzen hinsichtlich der IFN γ -Produktion gibt. Sowohl die Versuche mit Spender-Lymphozyten, als auch mit Patientenproben ergaben keinen deutlichen Unterschied. Zusätzlich wurden die Zellen der Patienten für sieben Tage stimuliert, auch hier konnte kein Anstieg der Spots gegenüber der 48-stündigen Stimulation gemessen werden. Es gibt wenige Studien, die sich mit dem direkten Vergleich von PHA *versus* PMA bzw. Ionomycin bezüglich der IFN γ -Produktion befassen haben. Baran et al. [71] verglichen in ihrer Arbeit PHA mit PMA und kamen zu der Erkenntnis, dass PHA besser geeignet sei und präzisere Analysen hinsichtlich der Zytokinproduktion lieferte. In einer anderen Arbeit von Mao et al. [72] wird berichtet, dass die Stimulierung mittels PMA keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD3 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Zellen ergaben. Da PHA in der Handhabung einfacher war und wir keine eindeutigen Vorteile für PMA/Ionomycin finden konnten, wurde PHA für die weiteren Versuche verwendet.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Reihenfolge der Gabe von MUC-1 und unspezifischem Stimulans, jeweils mit 24h Stimulationsdauer vor Zugabe des zweiten Agens, einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte. Es zeigte sich eine vermehrte Produktion von IFN γ , wenn zuerst das Stimulans und 24 Stunden später das MUC-1 Polypeptid zugefügt wurde. Kein Vorteil ergab sich, wenn die Zellen über Nacht mit MUC-1 kultiviert wurden und danach PMA/Ionomycin zugegeben wurde.

Zusammengefasst ergaben die Etablierungsversuche folgende Ergebnisse:

1. Die Stimulationsdauer wurde auf 48 Stunden festgelegt.
2. Als Stimulans diente PHA 5 μ g/ml.
3. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit PHA stimuliert, danach das MUC-1 hinzugegeben.

5.2 Analyse der Patientenproben

Insgesamt konnten die Proben von zwölf Patienten analysiert werden. Zunächst wurden die Zellen wie beschrieben aufgetaut, hierbei zeigte sich ein Phänomen, welches Smith et al. [73] als „Zellverklumpung“ bezeichneten. Diese Beobachtung scheint typisch für eingefrorene Zellen zu sein. Inwieweit dies die Ergebnisse beeinflusst, ist in der Literatur nicht beschrieben. Nach der Stimulation für 48 Stunden mit PHA erfolgte anschließend eine lichtmikroskopische Beurteilung. Hierbei war die Anordnung der Zellen von Bedeutung. Dabei lagern sich aktivierte Lymphozyten in einer ganz bestimmten Art aneinander, man spricht auch von einer „traubenförmigen“ Anordnung im Sinne eines klonalen Wachstums:

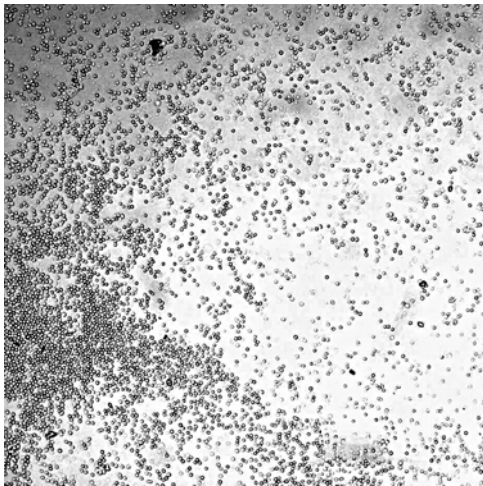


Abbildung 7
Repräsentative Aufnahme Patientenprobe unstimuliert.

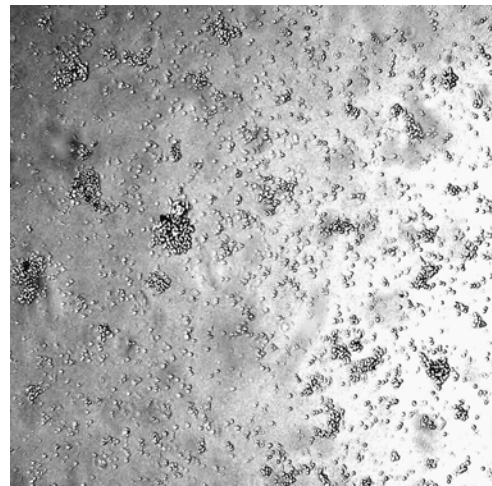


Abbildung 8 „traubenförmige“ Anordnung.
Repräsentative Aufnahme Patienten-Probe stimuliert für 48h mit PHA 5µg/ ml.

Dieses Phänomen konnte bei allen Patientenproben beobachtet werden und war ein Indiz dafür, dass eine Aktivierung bei allen Proben stattgefunden hatte. Jedoch war die Ausprägung im Vergleich zu den Spender-Lymphozyten deutlich schwächer.

Diese eingeschränkte T-Zellfunktion könnte eventuell auf das Tumorleiden zurückzuführen sein. Das Immunsystem wird hierbei durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. Kastelan et al. [74] untersuchten dies bei Blasenkarzinompatienten und fanden im Vergleich zu gesunden Patienten eine verminderte Anzahl an CD4+/- CD8+-Zellen, sowie eine eingeschränkte Aktivierbarkeit der Lymphozyten. Kokron et al. [75] konnten dies bestätigen. Sie wiesen auf eine generell verminderte Anzahl an Zellen, aber auch auf eine eingeschränkte lymphoproliferative Antwort gegen Antigene hin.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Zellzählanalyse ergaben zu keinem gemessenen Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Zellen mit BSA-Zusatz. Jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg des Zellwachstums zu allen Zeitpunkten durch die Zugabe von PHA. Verdeutlicht werden kann dies durch den Vergleich der Mediane (siehe Abbildung 1, Seite 37). Der beschriebene Effekt war bei den Patientenproben geringer ausgeprägt. Hinsichtlich des Zellwachstums für unbehandelte Zellen lag der Wert bei den Patientenproben bei $10 \times 10^5/\text{ml}$ gegenüber $13 \times 10^5/\text{ml}$ bei dem gesunden Spender. Die Werte für Zellen aktiviert mit PHA ergaben $14 \times 10^5/\text{ml}$ bei den Patientenproben gegenüber $18 \times 10^5/\text{ml}$ bei den gesunden Spendern. Dennoch zeigten diese Beobachtungen, dass die Patientenzellen proliferierten und bestätigten so die Ergebnisse des Thymidin-Proliferationsassays.

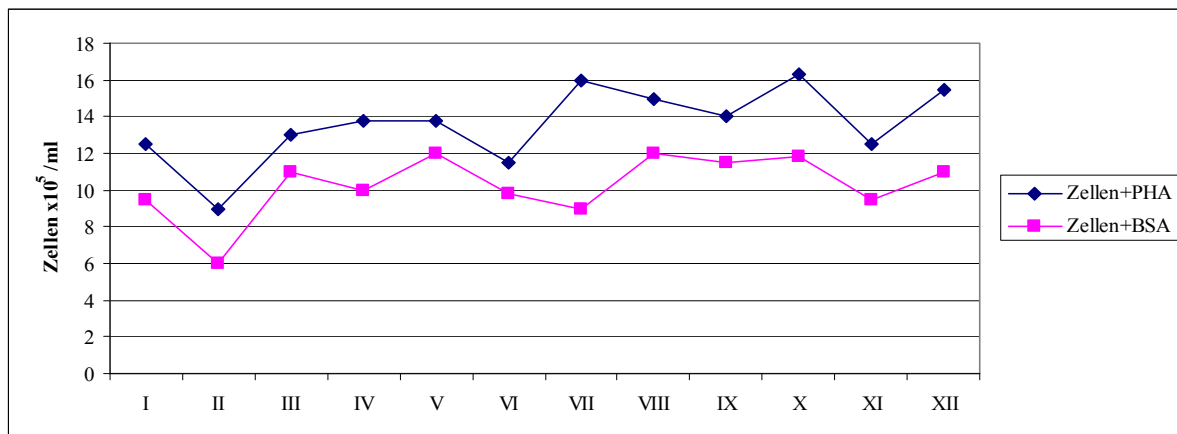


Abbildung 1.1 Zellzählung zu den Zeitpunkten der Blutprobenentnahmen.

Gemittelte Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen (I-XII). Zeitpunkt XIII aufgrund zu geringer Messdaten nicht eingezeichnet.

Wie aus Abbildung 1.1 hervorgeht, zeichnet sich eine Zunahme der Zellzahl von Beginn bis zum Ende der Blutentnahmezeitpunkte ab. Dies trifft sowohl für die unstimulierten als auch für die stimulierten Proben zu. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte unter Umständen der Einfluss der Lagerungszeit sein. Man könnte vermuten, dass die älteren Proben vom Beginn der Studie durch die längere Lagerung in Ihrer Proliferationsfähigkeit eingeschränkt waren. Auf die Bedeutung der Kryokonservierung wird aber im Verlauf noch genauer eingegangen. Man könnte allerdings auch die gesteigerte Wachstumsrate darauf zurückführen, dass die Vakzinierungstherapie einen positiven Einfluss auf die Proliferationseigenschaften der Zellen ausgeübt hat. Einen Anstieg der CD8⁺-Zellrate bei Karzinompatienten nach Vakzinierung konnten Pantuck et al. [76] sowie Sato et al. [77] in ihren Arbeiten verzeichnen.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten Snijdwint et al. [78], auch sie stellten eine erhöhte Proliferation von PBMC durch MUC-1 bei Ovarialkarzinompatienten fest.

Die Messung der IFN γ -Spots erfolgte wie beschrieben durch eine Computer-assistierte Video-Analyse am Bioreader 3000. An Hand der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass auch hier zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Messwerte für unbehandelte Zellen und Zellen mit BSA-Zusatz vorlag. Hingegen ließ sich ein Anstieg der Spots, sowohl bei den Zellen versetzt mit MUC-1 als auch bei den Zellen plus PHA erkennen. Einen zusammenfassenden Überblick darüber lieferte bereits Abbildung 2 (siehe Anhang). In Abbildung 6 (siehe Anhang) veranschaulichen die Box-Plots die gemessenen IFN γ -Spots zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutentnahmen. Zu drei Zeitpunkten bestand ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vergleiches Zellen allein und Zellen aktiviert mit MUC-1. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Ramanathan et al. [42], wo es ebenfalls zu einem Anstieg der IFN γ -Produktion nach MUC-Vakzinierung kam. Den größten Unterschied gab es zwischen unbehandelten Zellen und Zellen stimuliert mit PHA, hier war der Unterschied an sechs Zeitpunkten signifikant. Betrachtet man die Mediane (vgl. Abbildung 2, Seite 37) so liegt der Wert für Zellen allein und Zellen mit BSA-Zusatz bei 9 Spots, durch die Zugabe von MUC-1 kam es zu einem Anstieg auf zwölf Spots und die Zugabe von PHA bewirkte einen Anstieg auf 14 Spots.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass durch die Zugabe von PHA die IFN γ -Produktion angestiegen ist. Folglich bestätigt dies, dass die untersuchten Zellen erwartungsgemäß auf das Stimulans PHA reagierten. Dieser Effekt der Patientenzellen war im Vergleich zu den Zellen des gesunden Probanden deutlich geringer. Hier lagen die Messwerte für die unstimulierten Zellen bei 15 Spots gegenüber 45 Spots durch die Zugabe von PHA. Diese verringerte Mitogen-Stimulation von Karzinompatienten wurde unter anderem von Szopinski et al. [79] und Sobota et al. [80] beschrieben.

Obwohl die Höhe der IFN γ -Produktion durch MUC-1 geringer war, konnte dennoch ein Anstieg der Zytokinproduktion durch MUC-1 erreicht werden. In der Literatur ist dieser Unterschied von Kvarnström [81] beschrieben worden, der zeigen konnte, dass die Zytokinproduktion durch PHA gegenüber einer Allergen-Stimulation deutlich höher war.

Dass die Zytokinproduktion durch PHA- und/oder MUC-1 Stimulation in unserer Arbeit zwar meist erhöht aber nicht zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht waren, könnte Folge der eher geringen Probenzahl und der notwendigen Adjustierungen sein. Dies reduzierte die Aussagekraft des Wilcoxon-Tests erheblich. Die Zugabe von BSA ergab keine signifikanten

Resultate. Dies legt nahe, dass die Ergebnisse für PHA und MUC-1 nicht auf Artefakten beruhten. Wie in Abbildung 6 (siehe Anhang) illustriert, waren die Werte für PHA und MUC-1 höher im Vergleich zu den Zellen allein und Zellen mit BSA-Zusatz. Lediglich an den letzten drei Messpunkten war dies auf Grund weniger Messdaten nicht der Fall. Vermutlich sind daher die nicht signifikanten Unterschiede zwischen PHA und MUC-1 auf die geringe Anzahl an Patientenproben zurückzuführen. Dennoch schienen beide die Zellen zu aktivieren und eine $\text{IFN}\gamma$ -Produktion anzuregen, sowohl unspezifisch durch PHA als auch spezifisch durch MUC-1.

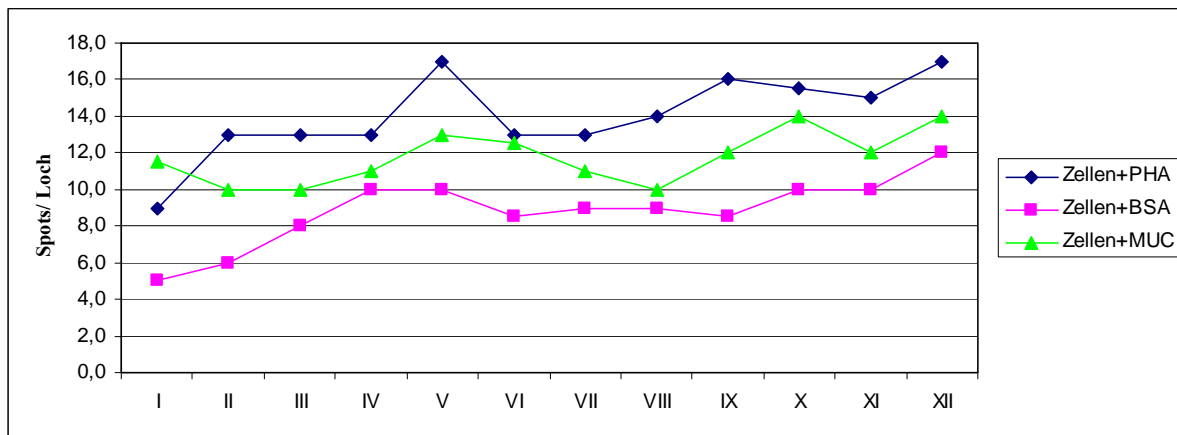


Abbildung 2.1 $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zu den Zeitpunkten der Blutprobenentnahmen. Ergebnisse des ELISPOT.

Gemittelte Werte jedes Patienten, zusammengefasst zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen (I-XII). Zeitpunkt XIII aufgrund zu wenig Messdaten nicht eingezeichnet

Abbildung 2.1 veranschaulicht die gemessenen und gemittelten $\text{IFN}\gamma$ -Spots zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutentnahmen. Wie oben beschrieben ist ersichtlich, dass durch die Zugabe von PHA und MUC-1 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen mehr $\text{IFN}\gamma$ produziert wurde. Der Effekt war bei PHA deutlich ausgeprägter.

Zusätzlich ließ sich aber auch hier über den Zeitverlauf eine Zunahme der Spots feststellen.

Auch wenn diese Zunahme im Verlauf nicht signifikant war, so lässt sich zumindest eine Tendenz erkennen. Wenn wir in diesem Zusammenhang von einer positiven „Anti-Vakzine-T-Zell-Antwort“ sprechen, so sollten folgende Kriterien erfüllt sein, auf die auch Coulie et al. [82] in Ihrer Arbeit hinwiesen:

1. Die Anzahl der gemessenen Zellen sollte nach der Vakzinierung ansteigen.
2. Die Zellen sollten das Antigen klar erkennen und wie in unserem Fall mit einer gesteigerten Zytokinproduktion reagieren.

Beide Kriterien konnten durch diese Studie erfüllt werden, so dass man daraus schließen konnte, dass die Vakzinierungstherapie mit dem tumorspezifischen MUC-1 Polypeptid zumindest hinsichtlich der IFN γ -Produktion einen positiven Einfluss auf die zelluläre Immunantwort ausgeübt hat.

Vergleicht man die Daten der ELISPOT-Messung so fällt auf, dass bei den Patientenproben generell wenig Spots gemessen wurden. Hierbei ist aber zu beachten, dass für die Interpretation der Ergebnisse verschiedene Faktoren berücksichtigt werden müssen. Ein Faktor ist die Einstellung der Zellzahl, die bei der Etablierung eines ELISPOTs eine wichtige Rolle spielt. Verwendet man zu wenig Zellen, sind die Messungen zu gering, mit zunehmender Zellzahl steigen zwar die Spots, allerdings werden die Ergebnisse auch schlechter auswertbar und durch Zunahme von unspezifischen Bindungen und des Hintergrundes können die Daten verfälscht werden [67, 83]. Vergleicht man die Literatur, so liegt die Einstellung meistens zwischen 10^4 bis 10^5 Zellen/Loch [62, 67, 83]. In unserem Fall wurden die Platten auf 30000 Zellen/Loch eingestellt.

Ein weiterer Faktor ist die eingeschränkte Immunfunktion bei Pankreaskarzinompatienten [84], welche sich in dieser Arbeit in einer verminderten Zytokinproduktion gegenüber Gesunden zeigte.

Beim Vergleich ähnlicher Arbeiten, die sich mit der T-Zell-Antwort bei einer Vakzinierungstherapie befasst hatten, zeigte sich in vielen Studien eine nur sehr geringe Antwort der T-Zellen gegen das Vakzin-Antigen. Zusätzlich wurde auf eine sehr niedrige Frequenz von CTL hingewiesen. Beispiele dafür sind Berichten von Coulie et al. [82, 85] sowie Soares et al. [86] zu entnehmen.

MUC-1 kann neben der Aktivierung des Immunsystems auch deutlich immunsuppressiv wirken. Möglicher Weise ist diese Eigenschaft von der Länge des MUC-1-Molekül abhängig. Agrawal et al. [87], Chang et al. [88] sowie Chan et al. [89] hoben in Ihrer Arbeit den negativen Einfluss von MUC-1 auf das Immunsystem hervor und wiesen auf die Überexpression bei Karzinompatienten hin. Sie fanden heraus, dass hohe MUC-1 Spiegel insbesondere großer Moleküle, die T-Zell-Proliferationsrate supprimierten. Dies könnte eine Erklärung für die verminderte Zellzahl der CTL sein. Welchen Effekt diese gegen Tumorantigene gerichteten Zellen jedoch hinsichtlich Tumorerkennung und Lyse in vivo haben ist noch nicht ganz geklärt. Allerdings könnte die verminderte Zellzahl dazu führen, dass es bei Karzinompatienten teilweise sehr schwierig sein kann, eine T-Zell-Antwort zu

generieren. Correa et al. [90] konnten in Ihrer Studie bei Brustkarzinompatienten eine gegen MUC-1 gerichtete T-Zell-Reaktion erst nach mehreren Restimulationen in vitro erreichen.

Zuletzt soll auf den bereits erwähnten Einfluss der Kryokonservierung eingegangen werden. In der Vergangenheit untersuchten viele Arbeitsgruppen die Bedeutung des Einfrierens, der Lagerung und des Auftauens hinsichtlich Zellzahlverlust, Zellvitalität und Zytokinproduktion. Kvarnström et al. [81] konnten zeigen, dass nicht die Dauer der Lagerung, sondern der Einfrier- und Auftauprozess den größten Einfluss auf die Zellen ausübte. In diesem Zusammenhang sind auch Kleeberg et al. zu nennen [91], die herausfanden, dass die PBMC von HIV-Patienten nach zwölf Jahren Kryokonservierung nur 10% der Lebensfähigkeit verloren hatten. Wang et al. [92], Smith et al. [73] sowie Kreher et al. [93] zeigten, dass eingefrorenen Zellen im Vergleich mit frischen Zellen hinsichtlich der Fähigkeit zur Zytokinproduktion keine gravierenden Unterschiede aufwiesen. Sowohl Kvarnström [81] als auch Venkataraman [53] konnten eine gesteigerte IFN γ -Produktion in den eingefrorenen Proben gegenüber frischen Zellen verzeichnen. Allerdings ist bei den oben genannten Beobachtungen zu berücksichtigen, dass der Einfrier- und Auftauprozess einen individuellen Effekt auf verschiedene Zytokine, verschiedene Stimuli und Patientengruppen ausübt.

Die Bedeutung des Einfrierens und Auftauens spiegelte sich auch in unserer Arbeit wieder. Testreihe I und II wurden mit frischen Zellen durchgeführt, alle anderen mit eingefrorenen Zellen. Vergleicht man die gemessenen Spots, so waren die Werten bei den frischen Zellen deutlich höher als bei den eingefrorenen Proben. Aus einer Arbeit von Tree et al. [94] geht hervor, dass nicht nur die Methode des Einfrierens, sondern auch die Wahl des Mediums die T-Zell-Antwort signifikant beeinflusst hatte. Dies alles unterstreicht die Bedeutung einer individuellen ELISPOT-Etablierung, zeigt aber auch die Schwierigkeit der Interpretation. Letsch [95] wies in seiner Arbeit darauf hin, dass verschiedene Studien eine Beziehung zwischen den mittels ELISPOT detektierten vakzine-induzierten T-Zellen und dem klinischen Verlauf vermuten lassen.

Bei der Analyse der Gesamtdaten der dieser Arbeit zugrunde liegenden klinischen Peptidvakzinestudie könnte ein vergleichbarer Überlebensvorteil der vakzinierten Patienten vorhanden sein. Allerdings konnte nur ein historisches Vergleichskollektiv zum Vergleich herangezogen werden [96], wodurch die Aussagekraft eingeschränkt ist.

Die Schlussfolgerungen, die wir an Hand der Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit ziehen konnten waren, dass sowohl der Anstieg der Zellzahl als auch die gesteigerte IFN γ -Produktion (vgl. Abb. 1.1 und 2.1, Seite 45, 47) als ein positiver Einfluss der Vakzinierungstherapie auf die zelluläre Immunantwort angesehen werden können. Dieser

könnte zu einem Überlebensvorteil für die vakzinierten Patienten geführt haben. Um dies zu überprüfen sind weitere prospektive kontrollierte randomisierte klinische Studien erforderlich.

6 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit wurden Proben von insgesamt 12 Patienten mit einem periampullären oder duktalem Pankreasadenokarzinom aus einer Phase I/II Studie zur in vivo Immunisierung mittels einer synthetischen Vakzine aus einem tumorspezifischen repetitiven MUC-1 Polypeptid und dem Adjuvans SB-AS-2 untersucht. Das tumorspezifische MUC-1 Polypeptid enthielt eine fünffache Wiederholung (sog. tandem repeats) des tumorspezifischen, 20 Aminosäuren-langen Grundpeptids des Mucin-I-Glykoproteins. Es ist beschrieben, dass dieses Peptid nach Vakzinierung Einfluß auf das Immunsystem nimmt. Es kommt zu einer vermehrten T-Zellproliferation sowie zu einer vermehrten Sezernierung von Antikörpern und Zytokinen. Ziel dieser Arbeit war es, die spezifische zelluläre Antwort der Immunzellen auf das MUC-1 Polypeptid zu untersuchen. Hierfür erfolgte die Etablierung eines IFN γ -ELISPOT-Assays, mit dem die spezifische, gegen das Tumorantigen MUC-1 gerichtete T-Zellantwort analysiert werden sollte. Für IFN γ ist beschrieben, dass es mit der spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Zytotoxizität korreliert. IFN γ kann sich als proinflammatorisches Zytokin positiv auf das Überleben der Patienten, auch beim Pankreaskarzinom, auswirken. Als Positivkontrolle zum Vergleich mit den Patientenproben wurden periphere Blutlymphozyten von einem gesunden Spender verwendet. In diesem Zusammenhang wurde die IFN γ -Sekretion nach unspezifischer (Stimulans PHA, 5 μ g/ml) bzw. spezifischer Stimulation (Stimulans MUC-1) gemessen und diese miteinander verglichen. Zusätzlich sollten eventuell im Zeitverlauf der Studie vorhandene quantitative Unterschiede in der Zytokinsekretion (IFN γ) sowie Proliferationseigenschaften herausgefunden werden. Zuletzt sollte der Einfluss der Lagerung, der Kryokonservierung und des Auftauens auf die Zytokinproduktion demonstriert werden.

Bei der Etablierung des IFN γ -ELISPOT-Assays galt es drei Hauptfaktoren zu untersuchen: die optimale Stimulationsdauer, die Verwendung des Stimulans PHA *versus* PMA/Ionomycin und die Reihenfolge der Gabe von Stimulans und MUC-1 Polypeptid. Die Ergebnisse unserer Etablierungsversuche an Hand der quantitativen Messung von Zellwachstum und IFN γ -sezernierenden Zellen ergaben:

1. Die Stimulationsdauer wurde auf 48 Stunden festgelegt.
2. Als Stimulans diente PHA 5 μ g/ml.
3. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit PHA stimuliert, danach das MUC-1 hinzugegeben. Bei den untersuchten Patientenproben konnte gezeigt werden, dass sowohl die unspezifische Stimulation als auch die spezifische Stimulation im Vergleich zur

Negativkontrolle zu einem Anstieg der IFN γ -Sekretion führte (durch PHA um ca. 50%, durch MUC-1 um ca. 30%). Der Effekt der unspezifischen Stimulation der Patientenzellen war im Vergleich zu den Zellen des gesunden Probanden deutlich geringer (um den Faktor 3). Betrachtet man den Zeitverlauf der einzelnen Blutentnahmen, so lässt sich eine Tendenz in einer vermehrten IFN γ -Sekretion erkennen, auch hier war der Effekt durch PHA stärker ausgeprägt als durch MUC-1 (vgl. Abb. 2.1, Seite 47).

Bei der Zellproliferationsmessung kam es zu einem signifikanten Anstieg des Zellwachstums zu allen Zeitpunkten durch die Zugabe von PHA *versus* unbehandelte Zellen. Der Effekt war auch hier bei den Pankreaskarzinompatienten gegenüber den Zellen des gesunden Probanden geringer ausgeprägt (um ca. 30%). Über den Zeitverlauf zeichnete sich eine Zunahme der Zellzahl von Beginn bis zum Ende der Blutentnahmezeitpunkte ab, sowohl für die unstimulierten als auch für die stimulierten Proben (vgl. Abb. 1.1, Seite 45). Die gesteigerte Wachstumsrate könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Vakzinierungstherapie einen positiven Einfluss auf die Proliferationseigenschaften der Zellen ausgeübt hat. Dies bestätigten auch Ergebnisse anderer Studien.

Insgesamt waren die gemessenen Spots, welche die IFN γ -sezernierenden Zellen widerspiegeln und die Zellzahlrate sehr niedrig. Dies kann mehrere Ursachen haben: zum einen die eingeschränkte Immunfunktion bei Pankreaskarzinompatienten, welche sich in dieser Arbeit in einer verminderten Zytokinproduktion gegenüber Gesunden zeigte; zum anderen wurde auch eine supprimierte T-Zellrate durch hohe MUC-1 Spiegel bei Überexpression von Karzinompatienten beschrieben. Auch nimmt die Kryokonservierung mit dem Einfrier-, Lagerungs- und Auftauprozeß einen Einfluß auf die Zellvitalität und Zytokinproduktion. Verschiedene Studien kamen hier zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei dieser Arbeit spiegelt sich jedoch der Einfluß in der Form wieder, dass die frischen, nicht kryokonservierten Zellen gegenüber den konservierten verstärkt Zytokine sezernierten.

Faßt man nun die Zunahme der IFN γ -Sekretion durch MUC-1 und die gesteigerte Wachstumsrate über den Zeitverlauf der Blutentnahmezeitpunkte zusammen, kann in diesem Zusammenhang von einer positiven „Anti-Vakzine-T-Zell-Antwort“ gesprochen werden, da zwei wichtige Kriterien erfüllt werden konnten: die Anzahl der gemessenen Zellen war nach Vakzinierung angestiegen und die Zellen haben das Antigen klar erkannt und, wie in unserem Fall, mit einer gesteigerten Zytokinproduktion reagiert. Ob hierdurch eine Verlängerung des Überlebens möglich ist müssen zukünftige Studien zeigen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kloppel G, Luttges J. WHO-classification 2000: exocrine pancreatic tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2001;85:219-28.
- [2] Klöppel G., Solcia E., Longnecker D.S., Capella C., Sobin L.H. Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. Springer-Verlag 1996; 11-27.
- [3] Solcia E., Capella C., Klöppel G. Tumors of the pancreas. Atlas of tumor pathology. Published by the armed forces institute of pathology. Washington, D.C. American registry of pathology; 3rd series faciles; 20; 1997.
- [4] Mörtel C.G.: Exocrine pancreas. Cancer Medicine, Holland J.F., Frei E. III Lea und Febiger, Philadelphia; 1559-1570 (1973).
- [5] Kath R. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002. Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen, 3. Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York, S. 231-239, 2002.
- [6] International Union Against Cancer. UICC. TNM Classification of malignant tumors, 6th. ed. Sobin LH., Wittekind CH. Wiley-Liss, Inc., New York 2002
- [7] Herold G. Innere Medizin Auflage 2004. S. 426.
- [8] Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir.* 2004 Apr;59(2): 99-111.
- [9] Gemeinsames Krebsregister (GKR), www.krebsregister-berlin.de
- [10] Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol.* 1996 Apr; 23(2):241-50.

- [11] Anderson LN, Cotterchio M, Gallinger S. Lifestyle, dietary, and medical history factors associated with pancreatic cancer risk in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control*. 2009 Feb 5
- [12] Meisterfeld R, Ehehalt F, Saeger HD, Solimena M. Pancreatic disorders and diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008 Sep;116 Suppl 1:S7-S12.
- [13] Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*. 2000 May; 84(3):565-73.
- [14] Maisonneuve P, Lowenfels AB. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis*. 2002; 20(1):32-7.
- [15] Lynch HT, Deters CA, Lynch JF, Brand RE. Familial pancreatic carcinoma in Jews. *Fam Cancer*. 2004; 3(3-4):233-40.
- [16] Ghadirian P, Lynch HT, Krewski D. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detect Prev*. 2003; 27(2):87-93.
- [17] Lynch HT, Brand RE, Deters CA, Fusaro RM. Update on familial pancreatic cancer. *Curr Gastroenterol Rep*. 2001 Apr; 3(2):121-8.
- [18] Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, Heise JW, Schulte KM, Colombo-Benkmann M, Schleicher C, Witzigmann H, Pridohl O, Ghadimi MB, Horstmann O, von Bernstorff W, Jochimsen L, Schmidt J, Eisold S, Estevez-Schwarz L, Hahn SA, Schulmann K, Bock W, Gress TM, Zugel N, Breitschaft K, Prenzel K, Messmann H, Endlicher E, Schneider M, Ziegler A, Schmiegel W, Schafer H, Rothmund M, Rieder H. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer*. 2004 Jul 20;110(6):902-6.

- [19] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988 May 20; 53(4):549-54.
- [20] Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, Vainio H, Porta M, Kauppinen T, Ojajarvi A, Boffetta P, Malats N. Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer. *Scand J Work Environ Health*. 1998 Jun; 24(3):165-74.
- [21] Heinemann V., Wilkowski R. *Dtsch Arztebl* 2005; 102:A 2720-2725
- [22] Heinemann V. Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 2002 Jun; 29(3 Suppl 9):23-31.
- [23] Van Cutsem E, Aerts R, Haustermans K, Topal B, Van Steenbergen W, Verslype C. Systemic treatment of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Mar; 16(3):265-74.
- [24] Bahra M, Neumann U. Surgical techniques for resectable pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2008; 177:29-38.
- [25] Wilkowski R, Wolf M, Heinemann V. Primary advanced unresectable pancreatic cancer.. *Recent Results Cancer Res*. 2008;177:79-93.
- [26] Loos M, Friess H, Kleeff J. Surgery of malignant pancreatic tumors.. *Radiologe*. 2009 Jan 21.
- [27] Bahra M, Jacob D. Surgical palliation of advanced pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2008;177:111-20.
- [28] Roll L. Adjuvant therapy in patients with pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2008;177:49-56.
- [29] Stieler JM, Oettle H.: (Diagnostic and treatment of advanced pancreatic cancer) *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Sep 23; 130(38):2146-8.

- [30] Stieler J. Immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2008;177:165-77.
- [31] Plate JM. Current immunotherapeutic strategies in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2007 Oct;16(4):919-43.
- [32] Staib L, Link KH, Beger HG. Immunotherapy in pancreatic cancer - current status and future. *Langenbecks Arch Surg.* 1999 Aug;384(4):396-404.
- [33] Wahab ZA, Metzgar RS. Human cytotoxic lymphocytes reactive with pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas.* 1991 May; 6(3):307-17.
- [34] Yamamoto K, Mine T, Katagiri K, Suzuki N, Kawaoka T, Ueno T, Matsueda S, Yamada A, Itoh K, Yamana H, Oka M. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination for patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2005 May; 13(5):874-83.
- [35] Lygidakis NJ, Ziras FA, Kyparidou E, Parissis J, Papadopoulou P, Venetsanou B. Combined immunopharmaceutical therapy of patients with unresectable pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1995 Nov-Dec; 42(6):1039-52.
- [36] Acres B, Limacher JM. MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy *ExpertRev Vaccines.* 2005 Aug; 4(4):493-502.
- [37] Yang E, Hu XF, Xing PX. Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histol Histopathol.* 2007 Aug;22(8):905-22.
- [38] Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2004 Jul; 122(1):61-9

-
- [39] Ueda M, Miura Y, Kunihiro O, Ishikawa T, Ichikawa Y, Endo I, Sekido H, Togo S, Shimada H, MUC1 overexpression is the most reliable marker of invasive carcinoma in intraductal papillary-mucinous tumor (IPMT). *Hepatogastroenterology*. 2005 Mar-Apr;52(62):398-403.
- [40] Singh R, Bandyopadhyay D. MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007 Apr;6(4):481-6.
- [41] Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J Surg Res*. 1996 Jun; 63(1):298-304.
- [42] Ramanathan RK, Lee KM, McKolanis J, Hitbold E, Schraut W, Moser AJ, Warnick E, Whiteside T, Osborne J, Kim H, Day R, Troetschel M, Finn OJ. Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Mar; 54(3):254-64.
- [43] Musselli C, Ragupathi G, Gilewski T, Panageas KS, Spinat Y, Livingston PO. Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int J Cancer*. 2002 Feb 10; 97(5):660-7.
- [44] Tsang KY, Palena C, Gulley J, Arlen P, Schlom J. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of MUC-1. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15; 10(6):2139-49.
- [45] Mukherjee P, Ginardi AR, Madsen CS, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, Agrawal B, Longenecker BM, Gendler SJ. MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment. *Glycoconj J*. 2001 Nov-Dec; 18(11-12):931-42.
- [46] Janetzki S, Cox JH, Oden N, Ferrari G. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol*. 2005; 302:51-86.

- [47] Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, Herr W, Schmittel A, Cerottini JC, Woelfel T, Eggermont AM, Keilholz U. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods*. 2000 Oct 20; 244(1-2):81-9.
- [48] A, Strobl S, Zaritskaya L, Baseler M, Shafer-Weaver K. New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials. *Malyguine Adv Exp Med Biol*. 2007;601:273-84.
- [49] Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay. *J Immunother*. 2000 May-Jun; 23(3):289-95.
- [50] Whiteside TL. Immunologic monitoring of clinical trials in patients with cancer: technology versus common sense. *Immunol Invest*. 2000 May; 29(2):149-62.
- [51] Matijevic M, Urban RG. Use of interferon-gamma ELISPOT in monitoring immune responses in humans. *Methods Mol Biol*. 2005; 302:237-52.
- [52] Tassignon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B, De Groote D. Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: Comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *J Immunol Methods*. 2005 Oct 30; 305(2):188-98.
- [53] Venkataraman M. Effects of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells. *Cryobiology*. 1995 Dec; 32(6):528-34.
- [54] Scheibenbogen C, Lee KH, Mayer S, Stevanovic S, Moebius U, Herr W, Rammensee HG, Keilholz U. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 1997 Feb; 3(2):221-6.

-
- [55] Hussein Ael-S, El-Moneim NA, Mahmoud MM, Abdel -Baky MM. The role of interferon-gamma and vitamin-A in modulating telomerase activity in breast cancer patients. *Egypt J Immunol.* 2003; 10(1):47-56.
- [56] Halma MA, Wheelhouse NM, Barber MD, Powell JJ, Fearon KC, Ross JA. Interferon-gamma polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. *Hum Immunol.* 2004 Nov; 65(11):1405-8.
- [57] Lalvani A, Moris P, Voss G, Pathan AA, Kester KE, Brookes R, Lee E, Koutsoukos M, Plebanski M, Delchambre M, Flanagan KL, Carton C, Slaoui M, Van Hoecke C, Ballou WR, Hill AV, Cohen J. Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *J Infect Dis.* 1999 Nov; 180(5):1656-64.
- [58] Doherty JF, Pinder M, Tornieporth N, Carton C, Vigneron L, Milligan P, Ballou WR, Holland CA, Kester KE, Voss G, Momin P, Greenwood BM, McAdam KP, Cohen J. A phase I safety and immunogenicity trial with the candidate malaria vaccine RTS,S/ SBAS2 in semi-immune adults in The Gambia. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Dec; 61(6):865-8.
- [59] Sivinski CL, Kohlgraf KG, VanLith ML, Morikane K, Tempero RM, Hollingsworth MA. Molecular requirements for CD8-mediated rejection of a MUC1-expressing pancreatic carcinoma: implications for tumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 2002 Aug; 51(6):327-40.
- [60] Ding C, Wang L, Marroquin J, Yan J. Targeting of antigens to B cells augments antigen-specific T-cell responses and breaks immune tolerance to tumor-associated antigen MUC1. *Blood.* 2008 Oct 1;112(7):2817-25.
- [61] Mukherjee P, Madsen CS, Ginardi AR, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, Agrawal B, Longenecker BM, Gendler SJ. Mucin 1-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *J Immunother.* 2003 Jan-Feb; 26(1):47-62.

- [62] Asai T, Storkus WJ, Whiteside TL. Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Mar; 7(2):145-54.
- [63] Gajewski TF. Monitoring specific T-cell responses to melanoma vaccines: ELISPOT, tetramers, and beyond. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Mar; 7(2):141-4.
- [64] Lewis JJ, Janetzki S, Schaed S, Panageas KS, Wang S, Williams L, Meyers M, Butterworth L, Livingston PO, Chapman PB, Houghton AN. Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide. *Int J Cancer*. 2000 Aug 1; 87(3):391-8.
- [65] von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, Rogatko A, Meropol N, Cooper HS, Davey M, McLaughlin S, Schlom J, Weiner LM. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2000 Jun; 6(6):2219-28.
- [66] Köppelle Winfried. Cell Viability- & Proliferation Assays ,Laborjournal 4/2002.
- [67] Malyguine A, Strobl SL, Shafer-Weaver KA, Ulderich T, Troke A, Baseler M, Kwak LW, Neelapu SS. A modified human ELISPOT assay to detect specific responses to primary tumor cell targets. *J Transl Med*. 2004 Mar 29; 2(1):9.
- [68] Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdaviifar S, Andersson L, Gaines H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2004 Sep; 292(1-2):1-15.
- [69] Schmielau J, Nalesnik MA, Finn OJ. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar; 7 (3 Suppl):933s-939s.

- [70] Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15; 61(12):4756-60.
- [71] Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Mar; 8(2):303-13.
- [72] Mao JH, Chen ZM, Tang YM, Liang L, Du LZ, Zhang Y. (Regulation of CD3, CD4 and CD8 expressions on PMA-activated human peripheral T cells) *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004 Mar; 33(2):155-9.
- [73] Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Sep; 8(5):871-9.
- [74] Kastelan Z, Lukac J, Derezić D, Pasini J, Kusić Z, Sosić H, Kastelan M. Lymphocyte subsets, lymphocyte reactivity to mitogens, NK cell activity and neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec; 23(6D):5185-9.
- [75] Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, Rizzo LV. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc.* 2004 Dec; 76(4):707-26.
- [76] Pantuck AJ, van Ophoven A, Gitlitz BJ, Tso CL, Acres B, Squiban P, Ross ME, Belldegrun AS, Figlin RA. Phase I trial of antigen-specific gene therapy using a recombinant vaccinia virus encoding MUC-1 and IL-2 in MUC-1-positive patients with advanced prostate cancer. *J Immunother.* 2004 May-Jun; 27(3):240-53.

-
- [77] Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M, Shinohara T, Hida N, Katagiri K, Sato K, Sato M, Yamada A, Yamana H, Harada M, Itoh K, Todo S. A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2004 Apr 5; 90(7):1334-42.
- [78] Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, van Zanten-Przybysz I, Hummel P, Nijman HW, Kenemans P, Hilgers J. Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls. *Cancer Immunol Immunother*. 1999 Apr; 48(1):47-55.
- [79] Szopinski J, von Kleist S, Panorska A, Roginska E, Rogala E, Rowinska-Zakrzewska E. Secretion of interleukin-2 (IL-2) and interferon (IFN gamma) in whole blood cell culture stimulated with mitogens in patients with lung neoplasms. *Pneumonol Alergol Pol*. 1999; 67(11-12):504-10.
- [80] Sobota V, Bubenik J, Indrova M, Vlk V, Jakoubkova J. Use of cryopreserved lymphocytes for assessment of the immunological effects of interferon therapy in renal cell carcinoma patients. *J Immunol Methods*. 1997 Apr 11; 203(1):1-10.
- [81] Kvarnstrom M, Jenmalm MC, Ekerfelt C. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology*. 2004 Oct; 49(2):157-68.
- [82] Coulie PG, van der Bruggen P. T-cell responses of vaccinated cancer patients. *Curr Opin Immunol*. 2003 Apr; 15(2):131-7.
- [83] Bailey T, Stark S, Grant A, Hartnett C, Tsang M, Kalyuzhny A. A multidonor ELISPOT study of IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IFN-gamma and TNF-alpha release by cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2002 Dec 15; 270(2):171-82.

- [84] Fortner JG, Kim DK, Hopkins L, Barrett MK, Pinsky CM, Day NK. Immunologic function in patients with carcinoma of the pancreas. *Surg Gynecol Obstet.* 1980 Feb; 150(2):215-8.
- [85] Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, Van Pel A, Lucas S, Godelaine D, Lonchay C, Marchand M, Van Baren N, Boon T. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev.* 2002 Oct; 188:33-42.
- [86] Soares MM, Mehta V, Finn OJ. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *J Immunol.* 2001 Jun 1; 166(11):6555-63.
- [87] Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med.* 1998 Jan; 4(1):43-9.
- [88] Chang JF, Zhao HL, Phillips J, Greenburg G. The epithelial mucin, MUC1, is expressed on resting T lymphocytes and can function as a negative regulator of T cell activation. *Cell Immunol.* 2000 May 1; 201(2):83-8.
- [89] Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS. Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer.* 1999 Aug 27;82(5):721-6.
- [90] Correa I, Plunkett T, Coleman J, Galani E, Windmill E, Burchell JM, Taylor-Papdimitriou J. Responses of human T cells to peptides flanking the tandem repeat and overlapping the signal sequence of MUC1. *Int J Cancer.* 2005 Jul 10; 115(5):760-8.
- [91] Kleeberger CA, Lyles RH, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Giorgi JV. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Jan; 6(1):14-9.

- [92] Wang SY, Hsu ML, Tzeng CH, Hsu HC, Ho CK. The influence of cryopreservation on cytokine production by human T lymphocytes. *Cryobiology*. 1998 Aug; 37(1):22-9.
- [93] Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2003 Jul; 278(1-2):79-93.
- [94] Tree TI, Roep BO, Peakman M. Enhancing the sensitivity of assays to detect T cell reactivity: the effect of cell separation and cryopreservation media. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec; 1037:26-32.
- [95] Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods*. 2003 Oct; 31(2):143-9.
- [96] Lohe N. Ergebnisse einer klinischen Phase I/II Studie zur in vivo Immunisierung von Patienten mit einem periampullären oder duktalem Pankreasadenokarzinom mittels einer MUC-1 Polypeptid Vakzine. Medizinische Dissertationsschrift 2006, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

8 Anhang

Abbildung 1 Zellwachstumszählung zusammengefasst (Zellwachstumszählung aus Ergebnisteil 4.4.)

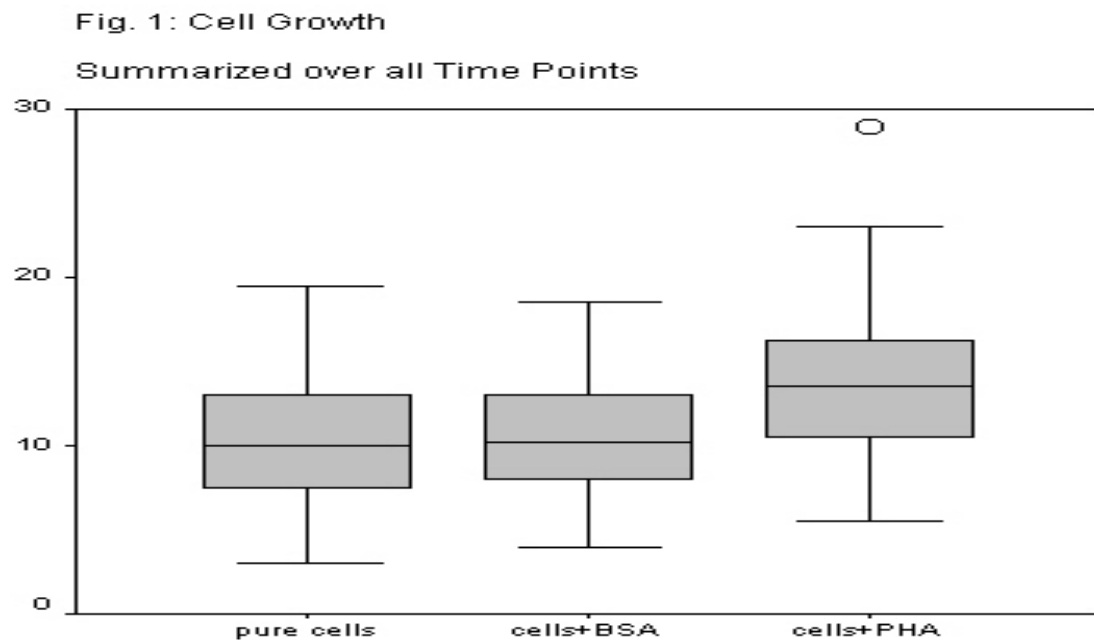


Abbildung 2 IFN γ -Produktion zusammengefasst (IFN γ -Produktion aus Ergebnisteil 4.4.)

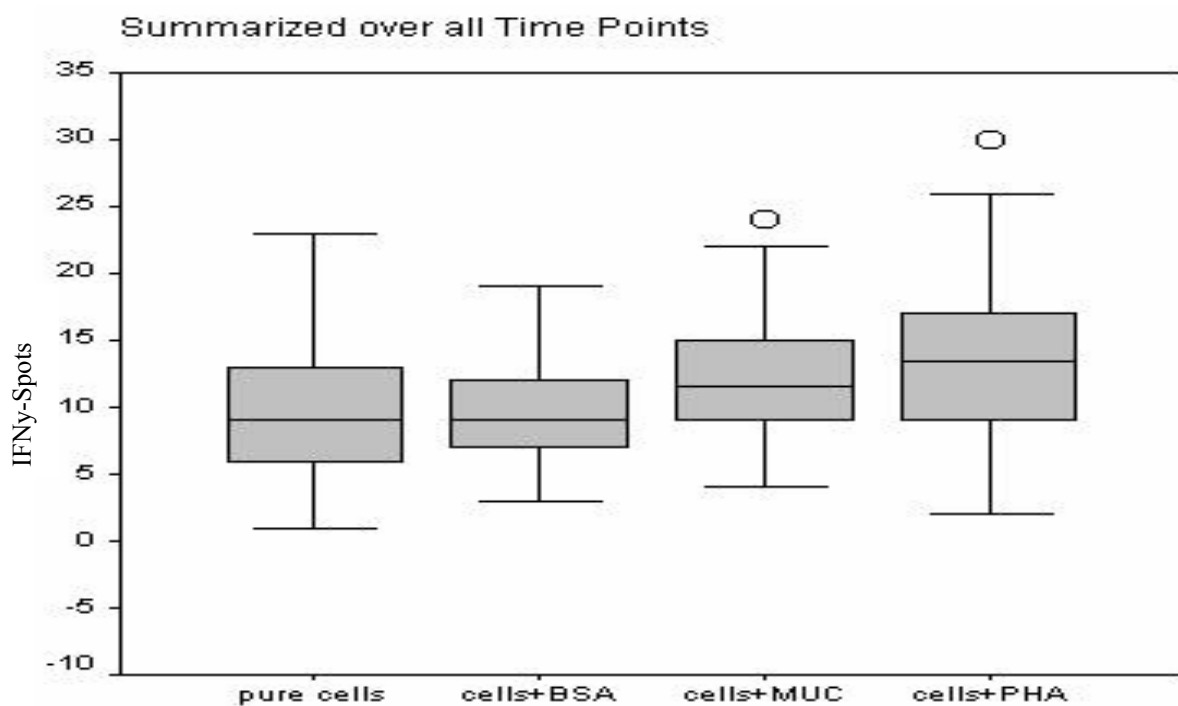


Abbildung 5: Zellwachstum zu den Blutentnahmepunkten

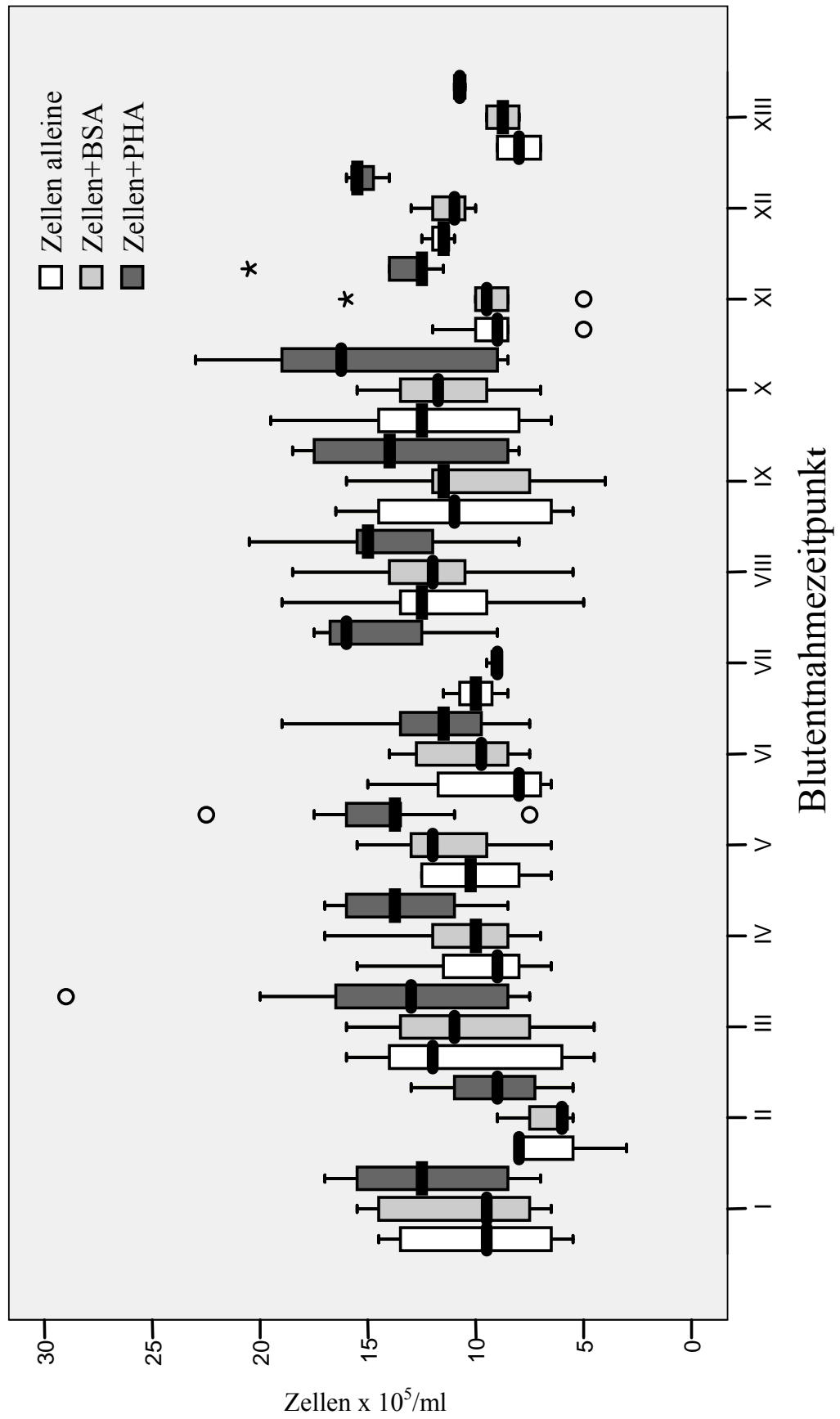


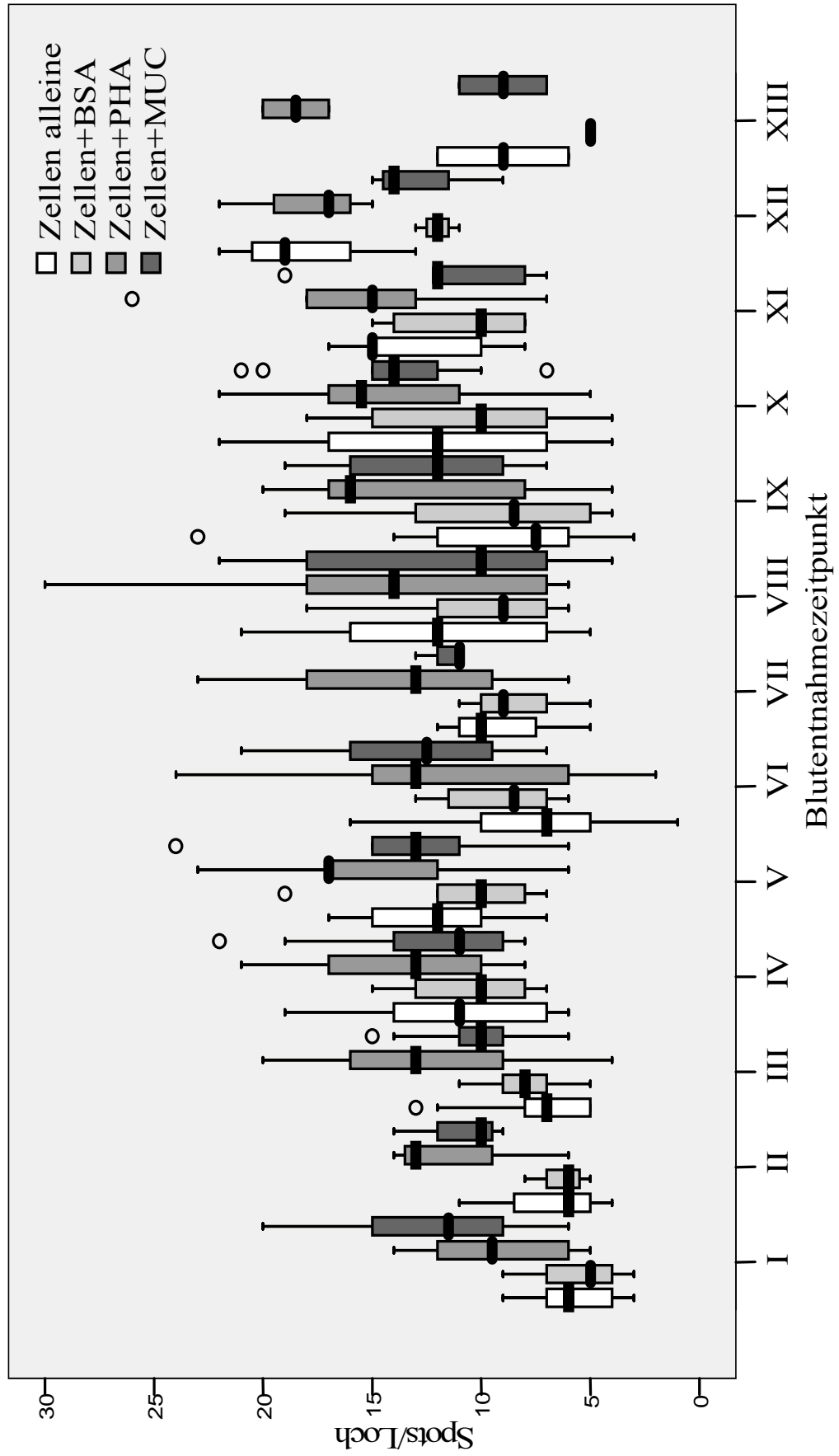
Abbildung 6: IFN- γ -Produktion zu den Blutentnahmezeitpunkten

Tabelle 23 Daten der statistischen Auswertung

Auswertung des Wilcoxon-Rang-Test für das Zellwachstum				
	n	p-Werte	p-Werte	
		A	B	
Zeitpunkt I	10	0,001	0,039	
Zeitpunkt II	3	-	-	
Zeitpunkt III	9	0,002	0,625	
Zeitpunkt IV	10	0,008	0,278	
Zeitpunkt V	10	0,002	0,080	
Zeitpunkt VI	8	0,012	0,016	
Zeitpunkt VII	3	-	-	
Zeitpunkt VIII	9	0,004	0,418	
Zeitpunkt IX	10	0,001	0,496	
Zeitpunkt X	10	0,002	0,576	
Zeitpunkt XI	5	0,031	0,250	
Zeitpunkt XII	3	-	-	
Zeitpunkt XIII	2	-	-	
Auswertung des Wilcoxon-Rang-Test für die IFN γ -Produktion				
	n	p-Werte	p-Werte	p-Werte
		A	B	C
Zeitpunkt I	10	0,001	0,496	0,001
Zeitpunkt II	3	-	-	-
Zeitpunkt III	9	0,008	0,289	0,020
Zeitpunkt IV	10	0,003	0,844	0,113
Zeitpunkt V	10	0,064	0,938	0,157
Zeitpunkt VI	8	0,016	0,086	0,012
Zeitpunkt VII	3	-	-	-
Zeitpunkt VIII	9	0,184	0,742	0,457
Zeitpunkt IX	10	0,016	0,363	0,059
Zeitpunkt X	10	0,039	0,777	0,078
Zeitpunkt XI	5	0,156	0,938	0,781
Zeitpunkt XII	3	-	-	-
Zeitpunkt XIII	2	-	-	-

A: Vergleich Zellen allein mit Zellen+PHA

B: Vergleich Zellen allein mit Zellen+BSA

C: Vergleich Zellen allein mit Zellen+MUC-1

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff für die freundliche Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Wolfram von Bernstorff für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und stets hilfreiche Unterstützung.

Für die Einführung und tatkräftige Hilfe bei den Laborarbeiten möchte ich mich bei Frau Claudia Tams, Frau Dr. rer. nat. Claudia Lutter und Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dipl. Math. Dipl. Phys. Dr. rer. nat. A. Caliebe vom Institut für mathematische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel für die Hilfestellung bei der Erhebung und Auswertung der statistischen Daten.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die stets hilfreich an meiner Seite standen und mir in meinem Leben alles ermöglicht haben.

Abschließen möchte ich mit dem Dank an meine liebevolle Ehefrau, die mich vom ersten Tag des Studiums begleitet hat und einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit nimmt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Geburtsdatum:	27.03.1978
Geburtsort:	Teheran
Familienstand:	verheiratet, ein Kind geb. 02.06.2008
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Prof. Dr. med. S.A.M. Mortazawi, Dermatologe Gundel Mortazawi, geb. Lohmann, Hausfrau
Geschwister:	Dr. med. dent. Daniela Bogena, Zahnärztin Dariusch Mortazawi, Dermatologe

Schulausbildung:

1984-1988	Gemeinschaftsgrundschule Reinshagen
1988-1997	Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Abitur am 05.06.1997

Zivildienst:

Sept. 1997- Sept.1998	Johanniter-Unfallhilfe Remscheid
-----------------------	----------------------------------

Medizinstudium:

1998-2000	Vorklinik Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden Physikum am 07.09.2000 in Dresden
2000-2005	Klinik Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 1. Staatsexamen am 28.08.2001 in Kiel 2. Staatsexamen am 23.03.2004 in Kiel 3. Staatsexamen am 14.06.2005 in Kiel

Famulaturen:

Orthochirurgie	Fabricius-Klinik Remscheid April 2001-Mai 2001
Chirurgie	Städtisches Krankenhaus Kiel Februar 2002-März 2002
Kinderchirurgie	Inselspital Bern Juli 2002-August 2002
HNO	Universitätsklinikum Kiel März 2003
Pädiatrie	Kinderarztpraxis in Freiburg i.Br. September 2003-Oktober 2003

Praktisches Jahr:

Innere Medizin	Städtisches Krankenhaus Kiel April 2004-Juli 2004
Orthochirurgie	Inselspital Bern September 2004-Oktober 2004
Kinderchirurgie	Inselspital Bern August 2004 und Oktober 2004-November 2004
Pädiatrie	Universitätskinderklinik Zürich Dezember 2004-März 2005

Assistenzarztstelle:

Viszeral- Tumor- und Kinderchirurgie	Klinikum am Gesundbrunnen Heilbronn, November 2005 bis Dezember 2007.
Kinderchirurgie	St. Elisabethenkrankenhaus Lörrach, seit Januar 2008.